



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)

**“PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE ANTIMICROBIANO POR FERMENTACIÓN DE  
SUERO LÁCTEO SUPLEMENTADO USANDO *L. lactis* UQ2”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el título de  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
L.T.A. ELISSE ACOSTA MORENO**

**DIRIGIDA POR:  
M.C. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SINODALES**

M.C. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ  
Presidente

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ  
Secretario

DR. ELEAZAR ESCAMILLA SILVA  
Vocal




DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ  
Suplente

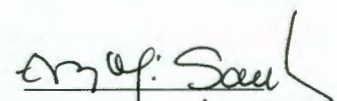
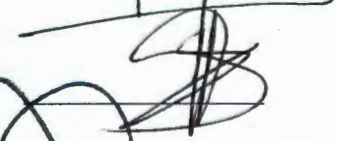
DR. SERGIO HUERTA OCHOA  
Suplente

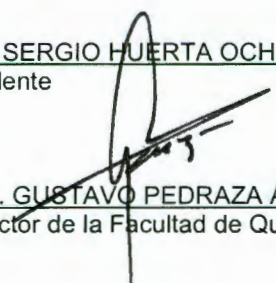
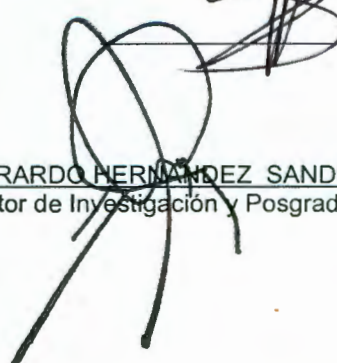
M.C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES  
Director de la Facultad de Química

DR. LUIS GERARDO HERNÁNDEZ SANDOVAL  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Septiembre 2005

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

No. Adq. H55883

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS

641.37

1185p

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO  
DE LA REPUBLICA

PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE ANTIMICROBIANO POR  
FERMENTACIÓN DE SUERO LÁCTEO SUPLEMENTADO USANDO  
*L. lactis* UQ2

## **T E S I S**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**Presenta:**

L.T.A. ELISSE ACOSTA MORENO

**Dirigida por:**

M.C. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

Santiago de Querétaro, Qro. México

Septiembre 2005

## RESUMEN

El uso de conservadores químicos ha incrementado la preocupación de consumidores, que demandan alimentos más naturales e inocuos. Por ello, surge la necesidad de desarrollar agentes antimicrobianos de origen natural como lo son algunos compuestos producidos por bacterias ácido lácticas. Entre éstos están las bacteriocinas, compuestos que presentan acción antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas, como es el caso de *Listeria monocytogenes*; bacteria patógena de interés en la salud. La producción de bacteriocinas se lleva a cabo en medios complejos pero su alto costo los hace no apropiados, por lo que es conveniente el uso de medios alternativos como el suero lácteo.

El objetivo fue obtener un ingrediente antimicrobiano producido mediante fermentación de *Lactococcus lactis* UQ2 en suero lácteo suplementado, que inhibiera el crecimiento de *L. monocytogenes*. Durante la fermentación se estudió la cinética de producción para obtener la mayor actividad antimicrobiana. El producto derivado de la fermentación se secó por aspersion obteniendo un ingrediente en polvo. Se evaluó el efecto antimicrobiano del ingrediente frente a *L. monocytogenes* Scott A inoculada en lechuga a una concentración de  $10^5$  UFC/g. La lechuga se almacenó a 6°C durante 48 h. Se realizó un diseño completamente al azar, en el cual se estudió la lechuga bajo diferentes tratamientos (a) sin tratar, (b) agua destilada, (c) solución de ácido láctico 2 g/L, (d) solución combinada de ácido láctico 2 g/L e ingrediente antimicrobiano 68,266 UA/g y (e) solución del ingrediente antimicrobiano 68,266 UA/g. La comparación de medias ( $\log_{10}$  UFC/g) entre tratamientos a diferentes tiempos se determinó usando la prueba de Tukey. La máxima actividad antimicrobiana desarrollada por *L. lactis* UQ2 en suero suplementado fue de 12,738 UA/g a las 11 h de fermentación, y después del secado se incrementó a 1, 556,480 UA/g. Los tratamientos (d) y (e) fueron los más efectivos ya que la reducción en la población de *L. monocytogenes* en lechuga fue de 2.26 ciclos logarítmicos observándose un efecto inmediato (60 min). Las condiciones de crecimiento y el uso del suero lácteo suplementado resultaron adecuados para la producción de bacteriocinas. El secado por aspersion no afectó la actividad antimicrobiana del ingrediente demostrando así que estas bacteriocinas son termoestables, por lo que debido a su especificidad y a su alta actividad, este ingrediente puede ser utilizado para la bioconservación de alimentos.

**Palabras clave:** Suero, bacteriocinas, ingrediente antimicrobiano, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*.

## SUMMARY

The addition of chemical preservatives has fallen into disfavor with consumers who are seeking foods that are more natural and safe. This has resulted in an incentive to search for preservatives of biological origin, like some antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria. Among these, bacteriocins are compounds that exert antibacterial effect against Gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen capable of causing human illness. The production of bacteriocins is usually performed in complex growth media, but their high cost make them unsuitable for a large-scale production. Thus, it seems more adequate to use alternative media like dairy whey. Our main objective was to obtain an antimicrobial ingredient produced by fermentation of *Lactococcus lactis* UQ2 on dairy whey that inhibits *L. monocytogenes* growth. During fermentation the time at which the maximum antimicrobial activity was recorded. Then, the fermentation the product was spray dried to obtain an antimicrobial ingredient in a powder form. This powder was used to evaluate its effect against *L. monocytogenes* Scott A inoculated onto lettuce leaves (5 log/g). The lettuce leaves were stored at 6°C during a 48 h period. A complete random design was made where we evaluated the following treatments: (a) non treated, (b) distilled water, (c) lactic acid solution 2 g/L, (d) combined solution of lactic acid 2 g/L and antimicrobial ingredient 68,266 AU/g and (e) solution of antimicrobial ingredient 68,266 AU/g. The comparison of means (log<sub>10</sub> CFU/g) between treatments at different times was calculated using Tukey's test. The highest antimicrobial activity was 12,738 AU/g after 11 h of fermentation which after spray-drying increased to 1,556,480 AU/g. The lettuce treatments (d) and (e) had 2.26 log decrease in a population of *L. monocytogenes*, and they were considered the more effective treatments. The dairy whey was a good alternative culture medium for bacteriocin production. It was also demonstrated that the spray-drying process did not affect the antimicrobial activity. Due to the specificity against *L. monocytogenes* and high activity, this ingredient may be useful for the biopreservation of foods.

**Key words:** Dairy whey, bacteriocins, antimicrobial ingredient, *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes*

*A mi Madre, una especial dedicatoria y  
agradecimiento, ya que por ella  
y para ella es todo lo que soy.*

*A Christian, por que caminamos juntos en esta etapa,  
por que de ti obtuve la fuerza. Gracias por tu paciencia  
y por tu total dedicación a mi bienestar.*

*A Lucero, Felipe y Andrés por sus consejos y por ser un  
soporte grande para mí.*

*A Fortino, por su ayuda, participación e interés  
siempre. Muchas gracias.*

*A mis Tíos, Raquel, Józef, Joaquín, Paty, Alicia y a mis  
primos, ya que de ustedes he recibido siempre un apoyo  
incondicional.*

*A mis maestros, por su enseñanza y profesionalismo.*

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca otorgada en el periodo 2002-2004, ya que a través de este apoyo se fomenta la investigación continua.

Al Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, por el conocimiento y experiencia adquiridos durante este periodo, que seguro serán de ayuda a mi desarrollo profesional.

A la Maestra Blanca E. García Almendárez, por ser la guía en la realización de este trabajo aunado a que participó activamente en el mismo.

Al Doctor Carlos Regalado, por permitirme trabajar en su equipo y por haber confiado en mí para poder estar en el Posgrado.

A mis sinodales, la Doctora Eva María Santos, al Doctor Eleazar Escamilla y al Doctor Sergio Huerta por sus consejos y aportaciones.

A mis amigas, Erika, Shirley, Tania y Rocío, que me aconsejan de la manera correcta, gracias por su valiosa amistad.

A mis compañeros de Laboratorio, Francisco, Claudia, Diana, Anayanci y Estrella, que por ustedes el trabajo se hizo siempre más agradable.

A mis compañeros de Maestría, Alma, Lorenzo, Cuauhtémoc, Estela, Iván, Flavio, Pilar, Tania, Mundo, Roberto, Francisco y Chepis. A todos y a cada uno de ustedes les agradezco la ayuda que me brindaron, porque en ustedes encontré apoyo ilimitado siempre.

A mi amiga Alma, por su amistad sincera, por escucharme y orientarme. Gracias Almiux, por que esta etapa que vivimos no hubiera sido la misma sin ti.

A mi amigo Lorenzo, que nunca se cansó de ayudar y de hacerme pasar buenos momentos. Te agradezco también tu confianza.

# ÍNDICE

	Página
Resumen	i
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Barreras Múltiples	3
2.2 Bacterias ácido lácticas	3
2.2.1 Metabolismo de carbohidratos	4
2.2.2 Clasificación a nivel género	5
2.2.2.1 <i>Lactococcus</i>	7
2.2.3 Componentes antimicrobianos de BAL	7
2.2.4 Efecto combinado de agentes antimicrobianos	12
2.2.5 Bacteriocinas	13
2.2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas	15
2.2.5.2 Bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus</i>	18
2.2.5.3 Mecanismo de acción	20
2.2.5.4 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos	21
2.2.5.5 Producción de bacteriocinas	23
2.3 Suero lácteo	24
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	28
2.4.1 Legislación sobre <i>L. monocytogenes</i>	31
2.5 Uso de las bacteriocinas y/o cultivos bacteriocinogénicos para inhibir el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.	32
2.6 Lechuga	36
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
4.1 Objetivo general	38
4.2 Objetivos específicos	38
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
5.1 Cepas	39
5.2 Medios de cultivo	39
5.3 Producción de bacteriocinas de <i>L. lactis</i> UQ2 en fermentador	41
5.4 Preparación del extracto libre de células (ELC)	41
5.5 Ensayo de actividad antimicrobiana	41
5.6 Concentración del ELC	42
5.7 Cinética de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano en Caldo Soya Trypticaseina (CST)	42



5.8	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del ingrediente antimicrobiano frente a <i>L. monocytogenes</i>	42
5.9	Determinación de la concentración mínima inhibitoria del ácido láctico frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A	43
5.10	Efecto combinado de dos compuestos antimicrobianos: Ingrediente en polvo y ácido láctico	43
5.11	Comparación con ingrediente comercial	43
5.12	Electroforesis en Sistema Tris-Tricina e identificación de la banda con actividad.	44
5.13	Cinética de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en lechuga	45
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>48</b>
6.1	Crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 y producción de bacteriocina	48
6.2	Obtención del ingrediente en polvo	52
6.3	Cinética de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano en CST	57
6.4	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ingrediente antimicrobiano frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A	60
6.5	Determinación de la CMI del ácido láctico frente a <i>L. monocytogenes</i> Scott A	63
6.6	Efecto combinado de dos compuestos antimicrobianos: Ingrediente en polvo y ácido láctico	65
6.7	Comparación con ingrediente comercial	68
6.8	Análisis del ingrediente mediante electroforesis en el sistema Tris-Tricina	71
6.9	Cinética de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en lechuga	74
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Fermentación de glucosa en bacterias del ácido láctico fermentativas y no fermentativas	6
2 Ruta de la lactosa utilizada por <i>Lactococcus lactis</i>	8
3 Isoblograma	14
4 Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 y producción de bacteriocina en suero lácteo suplementado	50
5 Actividad antimicrobiana a las 11 h de fermentación del ELC utilizando <i>M. luteus</i> NCIB8166 como microorganismo indicador	51
6 Ingrediente antimicrobiano en polvo	53
7 Actividad antimicrobiana del ingrediente antimicrobiano en polvo después del secado por aspersión utilizando <i>M. luteus</i> NCIB8166 como microorganismo indicador	55
8 Cuenta en placa de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en Agar Soya Trypticaseina (AST) a las 6 h	59
9 CMI del ingrediente antimicrobiano contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en CST	62
10 CMI del ácido láctico contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en CST	64
11 Isoblograma de CMI's para la combinación del ingrediente antimicrobiano y ácido láctico en CST contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	67
12 Comparación del efecto antilisterial del ingrediente antimicrobiano contra DuraFresh 5005™ en CST	70
13 Gel de electroforesis en sistema Tris-Tricina teñido con azul de Coomassie	72
14 Identificación de la banda con actividad antimicrobiana contra <i>M. luteus</i> NCIB8166	73
15 Cinética de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en lechuga	78
16 Método de secado en campana de flujo laminar de lechuga inoculada con <i>L. monocytogenes</i>	80
17 Ajuste de Modelo para el Control 1	91
18 Ajuste de Modelo para el Control 2	92
19 Ajuste de Modelo para el ácido láctico	93
20 Ajuste de Modelo para la solución combinada	94
21 Ajuste de Modelo para el Ingrediente antimicrobiano	95

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página	
1	Características generales de bacteriocinas	16
2	Composición del suero dulce	26
3	Propiedades químicas y fisicoquímicas de las proteínas del suero	
4	Proteínas menores del suero	27
5	Brotos de listeriosis en alimentos	30
6	Aplicación de bacteriocinas y/o cultivos bacteriocinogénicos con actividad antilisterial en alimentos	33
7	Composición del suero lácteo suplementado	40
8	Composición del medio Assay	40
9	Combinaciones de Ingrediente y Ácido Láctico	43
10	Actividad Antimicrobiana antes y después del secado por aspersión utilizando a <i>M. luteus</i> NCIB8166 como microorganismo indicador	54
11	Cinética de inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano (259,413 UA/g) en CST	58
12	Población ( $\log_{10}$ UFC/g) de <i>Listeria monocytogenes</i> después de aplicar los tratamientos en lechuga romana almacenada a 6 °C	79
13	ANOVA a las 0 h de almacenamiento de lechuga	89
14	ANOVA a la 1ra. h de almacenamiento de lechuga	89
15	ANOVA a la 3ra. h de almacenamiento de lechuga	89
16	ANOVA a la 6ta. h de almacenamiento de lechuga	90
17	ANOVA a la 12va. h de almacenamiento de lechuga	90
18	ANOVA a las 24 h de almacenamiento de lechuga	90
19	ANOVA a las 48 h de almacenamiento de lechuga	90

## I. INTRODUCCION

Cada año ocurren aproximadamente 76,000,000 de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) debido a la resistencia de los microorganismos (mo) patógenos a los métodos comunes de conservación, la industria de alimentos tiene el reto de desarrollar e introducir factores de conservación combinados que sean costo-efectivos y que trabajen sinérgicamente contra mo patógenos (Cleveland *et al.*, 2003). Estos factores de conservación combinados (físicos, químicos y/o microbiológicos) han sido propuestos como la base de las barreras múltiples para la conservación de alimentos (Leistner y Gorris, 1995). Se propone que algunos cultivos bacteriocinogénicos y/o sus bacteriocinas podrían servir como una barrera útil en la conservación de alimentos (Stiles, 1996).

Por otra parte, se ha incrementado la demanda de hortalizas listas para su consumo, especialmente porque son fáciles y prácticas de usar. Las principales características de las frutas y hortalizas listas para consumo son: la presencia de superficies cortadas o tejido dañados; mínimo procesamiento que no asegura la esterilidad o estabilidad microbiana del producto; metabolismo activo del tejido de la planta; y producto encerrado en empaque. Dichas características propician el crecimiento de los microorganismos en este tipo de productos (Nguyen-the y Carlin, 1994).

Se han reportado algunos brotes de listeriosis asociados al consumo de frutas y hortalizas. Debido a la alta mortalidad asociada con *L. monocytogenes*, la FDA establece una política de cero tolerancia (niveles permitidos no detectables) en alimentos listos para consumo (Leverentz *et al.*, 2003).

El cloro es el desinfectante químico más empleado sin embargo, no es muy eficiente en frutas y hortalizas crudas ya que el contacto con materia orgánica convierte el cloro activo a formas inactivas. Un estudio demostró que la mayor reducción de *L. monocytogenes* en lechuga y col tratada con 200 ppm de cloro fue de 1.3 a 1.7 log UFC/g y 0.9 a 1.2 log UFC/g respectivamente (Beuchat *et al.*, 1998).

Existe por consecuencia, una necesidad de factores de conservación que ayuden a prevenir la multiplicación y sobrevivencia de esta bacteria en los alimentos.

El presente trabajo de tesis se enfoca principalmente a obtener un ingrediente antimicrobiano producido mediante la fermentación de *Lactococcus lactis* UQ2 en suero lácteo suplementado, que inhiba el crecimiento de *L. monocytogenes* en medio de cultivo

y en lechuga. También, se consideró importante estudiar el efecto antimicrobiano combinado del ácido láctico y del ingrediente para evaluar la eficiencia de esta tecnología de barreras múltiples.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Barreras Múltiples

Con el incremento de la severidad de los procesos térmicos se ve afectada la calidad sensorial de los alimentos por lo que el consumidor prefiere alimentos mínimamente procesados y que además sean microbiológicamente estables e inocuos. Una tecnología que contribuye a resolver estos objetivos es la aplicación de factores combinados de conservación (llamados barreras). Esto es, por que si se aplican combinaciones de barreras leves de diferentes factores de conservación, la calidad sensorial de los alimentos será afectada en menor proporción. Mediante una combinación adecuada de las barreras se puede obtener una estabilidad microbiana, así como también se pueden mantener las propiedades nutrimentales de los alimentos.

Las barreras más importantes utilizadas en la conservación de alimentos son la temperatura (alta o baja), la actividad acuosa ( $a_w$ ), la acidez (pH), los conservadores (ej. nitrito, sorbato, sulfito) y los microorganismos competitivos (Alzadora *et al.*, 2000). Recientemente el uso de algunos cultivos bacteriocinogénicos y/o sus bacteriocinas se han sugerido para servir como una útil barrera de conservación (Stiles, 1996).

En este ámbito las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un gran potencial ya que éstas conservan los alimentos como resultado del crecimiento competitivo, por productos de su metabolismo y por la producción de bacteriocinas (Stiles, 1996). Así mismo, las BAL son inocuas y durante el almacenamiento dominan naturalmente la microflora en varios alimentos.

### 2.2 Bacterias Ácido Lácticas

Se define a la típica BAL como Gram positiva, no esporulada, catalasa negativa, no aerobia pero aerotolerante, no fácil de cultivar, acidúricas y estrictamente fermentativas con el ácido láctico como principal producto final. Son cocos, cocobacilos o bacilos con una composición de DNA de menos del 50 % mol de C + G (Vandamme *et al.*, 1996). Los miembros de este grupo no tienen porfirinas ni citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y por tanto, obtienen la energía sólo por fosforilación a nivel del sustrato. Todas las bacterias del ácido láctico crecen anaeróbicamente. No obstante, a

diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno y pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo; son por tanto, anaerobios aerotolerantes. Algunas cepas pueden usar oxígeno con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa, produciendo  $H_2O_2$ , aunque la mayoría de las cepas no poseen catalasa y eliminan el  $H_2O_2$  mediante enzimas alternativas, tales como las peroxidasa.

La mayor parte de las bacterias del ácido láctico obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables; están por tanto restringidas a hábitats ricos en azúcares. Normalmente, su capacidad biosintética es limitada y sus complejos requerimientos nutritivos incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Madigan *et al.*, 2000).

En los alimentos, las bacterias ácido lácticas contribuyen al sabor y textura de productos fermentados e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos por la producción de grandes cantidades de ácido láctico y por la producción de sustancias inhibitorias (bacteriocinas). Se conoce que muchas bacterias ácido lácticas tienen un impacto positivo en la salud del hombre y de los animales (Vandamme *et al.*, 1996).

Históricamente, la conservación de los alimentos por la fermentación de BAL era un proceso empírico en el cual los alimentos crudos sufrían un cambio que resultaba en un alimento diferente con mejora en sus cualidades de conserva. Una amplia variedad de alimentos crudos son conservados por fermentación de bacterias ácido lácticas, incluyendo leche, carne, frutas y verduras (Daeschel, 1989).

El extensivo consumo de productos que contienen BAL sin efectos negativos a la salud de los consumidores les ha dado el estatus de generalmente reconocido como seguro, GRAS (Muriana, 1996).

### **2.2.1 Metabolismo de Carbohidratos**

Una diferencia destacada entre subgrupos de las BAL está en la naturaleza de los productos formados durante la fermentación de azúcares. Un grupo llamado homofermentativo tiene prácticamente un solo producto de fermentación, el ácido láctico, mientras que otro grupo llamado heterofermentativo da otros productos principalmente etanol y  $CO_2$ , así como lactato. La figura 1 muestra las vías abreviadas de la fermentación de la glucosa por bacterias de estos dos grupos de organismos. Las diferencias observadas en los productos de fermentación están determinadas por la presencia o

ausencia de la enzima aldolasa, una de las enzimas clave de la glucólisis. Los heterofermentadores carecen de aldolasa y no pueden romper la fructosa bifosfato a triosa fosfato. En cambio, oxidan la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, que luego descarboxilan para producir pentosa fosfato; ésta a su vez, se rompe en triosa fosfato y acetil fosfato mediante la enzima fosfocetolasa. Los heterofermentadores finalmente convierten la triosa fosfato en ácido láctico, con producción de un mol de ATP, mientras que el acetil fosfato acepta electrones del NADH generados durante la producción de pentosa fosfato y es así convertido en etanol sin producir ATP. Debido a esto, los heterofermentadores, producen sólo 1 mol de ATP a partir de la glucosa, en vez de los dos moles producidos por los homofermentadores. Debido a que los heterofermentadores descarboxilan el 6-fosfogluconato, dan CO<sub>2</sub> como producto de la fermentación, mientras que los homofermentadores producen muy poco CO<sub>2</sub> o nada. En cuanto a las enzimas, los heterofermentadores, se caracterizan por no tener aldolasa y por la presencia de fosfocetolasa. Muchas cepas de heterofermentadores pueden usar O<sub>2</sub> como aceptor de electrones, con una flavoproteína que actúa como donador. En esta reacción, la mitad del NADH generado a partir de la oxidación de glucosa a ribosa es transferida a una flavina y a O<sub>2</sub>. El acetilfosfato puede convertirse entonces en acetato en vez de ser reducido a etanol, y se sintetiza un ATP adicional (Madigan *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Clasificación a nivel género

Las BAL son generalmente restringidas a los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranulum*, *Gemella*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Melissococcus* y *Saccharococcus* no son generalmente considerados como BAL, aunque pueden hasta cierto punto cumplir con la definición dada anteriormente (Vandamme *et al.*, 1996). Dentro de estos géneros, uno de los más estudiados es el género *Lactococcus*, ya que se emplea como cultivo iniciador para productos lácteos fermentados: queso, leche fermentada, kefir. Además, también es importante ya que produce nisina, única bacteriocina aprobada por la FDA para su utilización en forma pura en los alimentos.



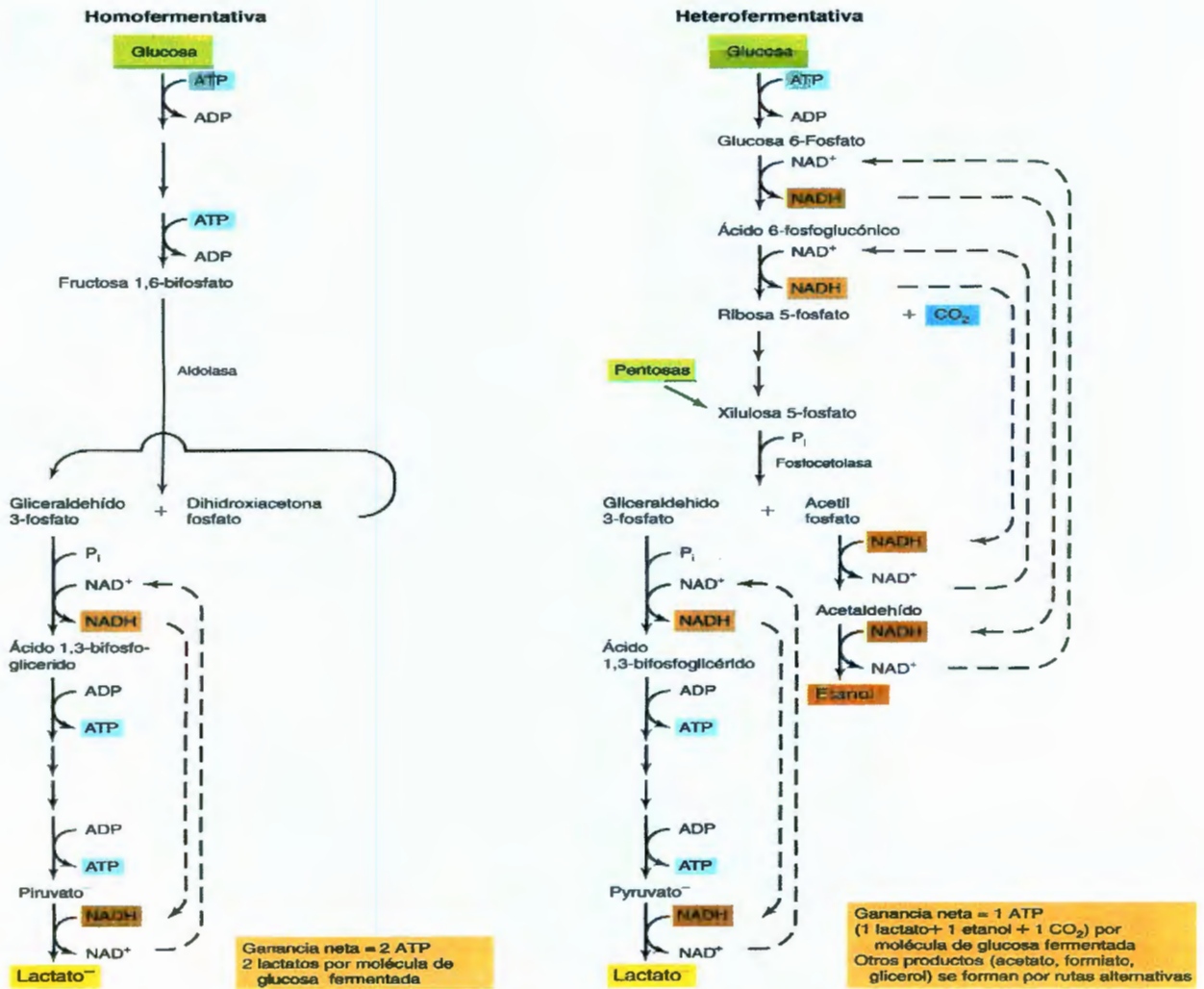


Figura 1. Fermentación de glucosa en bacterias del ácido láctico fermentativas y no fermentativas (Madigan *et al.*, 2000).

### 2.2.2.1 *Lactococcus*

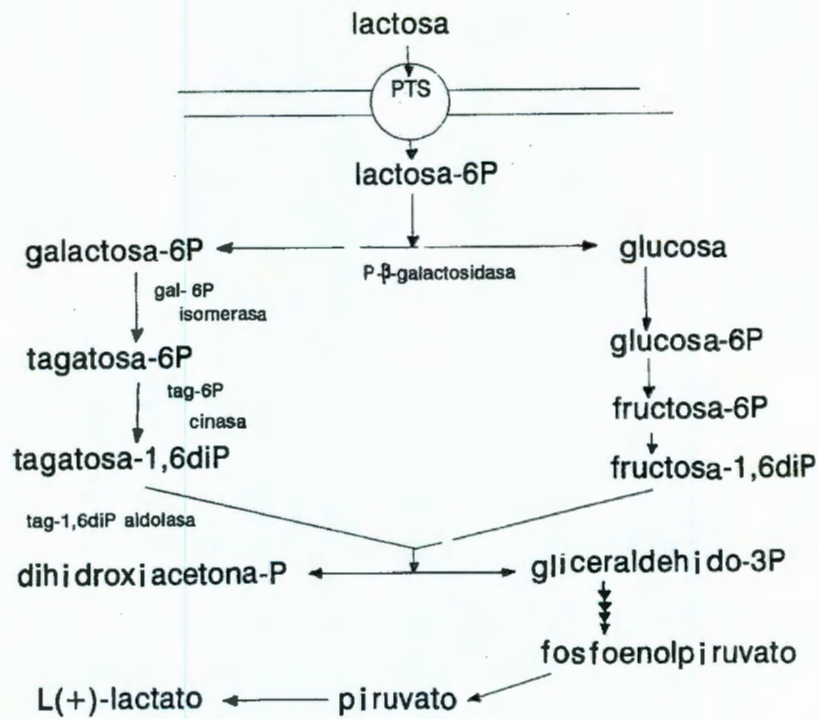
El género *Lactococcus* son cocos gram positivos, anaerobios facultativos que producen L (+) ácido láctico a pesar de que no poseen el ciclo del ácido cítrico ni una cadena respiratoria. Son capaces de crecer en presencia de O<sub>2</sub> debido a ciertas enzimas que metabolizan el O<sub>2</sub> como la superóxido dismutasa o NADH oxidasas. Su morfología consiste en células esféricas u ovoides de 0.5–1µm de diámetro que aparecen aisladas, en pares o en cadenas. Puede ser diferenciado de *Pediococcus* y *Leuconostoc* por sus principales productos de fermentación de la glucosa.

El género *Lactococcus* comprende las especies: *Lactococcus lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* y *Lc. piscium* (Wood y Holzapfel, 1995). El primer cultivo puro bacteriano obtenido a nivel mundial y descrito científicamente fue *L. lactis* en 1873 por Joseph Lister (Fernández-Escartín, 2000). El metabolismo de los ingredientes de la leche (lactosa, caseína, citrato y otros) por las dos subespecies *lactis* y *cremoris* de *Lactococcus lactis* proveen la base para la fermentación espontánea e industrial de la leche a leche agria y muchos tipos de quesos (Wood y Holzapfel, 1995). Algunas cepas de *Lc. lactis* producen bacteriocinas con un espectro relativamente estrecho contra bacterias gram positivas, incluyendo *Clostridium botulinum* y sus esporas (Stiles y Holzapfel, 1997).

La ruta bioquímica de la lactosa, la cual es la base de la aplicación industrial de los lactococci ha sido elucidada (Figura 2). Lactosa 6-fosfato, producto de translocación por un sistema fosfotransferasa específico (PTS), es dividido por la fosfo-β-galactosidasa en glucosa y galactosa 6-fosfato. Que es posteriormente metabolizado vía la ruta tagatosa 6-fosfato en triosa fosfato. Ambas rutas homofermentativas permiten la formación de ácido L (+) láctico, el cual es excretado al medio (Wood y Holzapfel, 1995).

### 2.2.3 Componentes Antimicrobianos de las BAL

Estudios recientes, confirman que los alimentos fermentados se conservan bien debido al efecto de acidificación que ciertas bacterias imparten al alimento por la conversión de azúcares a ácidos orgánicos. La reducción del pH y la eliminación de grandes cantidades de carbohidratos por la fermentación son las primeras acciones de conservación que estas bacterias desarrollan en los alimentos fermentados.



**Figura 2.** Ruta de la lactosa utilizada por *Lactococcus lactis* (Ray y Daeschel, 1992).

Sin embargo, también es reconocido que las BAL son capaces de producir sustancias inhibitorias además de los ácidos orgánicos que son antagonistas hacia otros microorganismos. Estas sustancias son producidas en cantidades más pequeñas e incluyen el peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, bacteriocinas y productos de reacción secundaria tales como el ión hipotiocianato generado por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y el tiocianato (Daeschel, 1989).

**Ácido acético:** es utilizado en forma de vinagre que es producido por la conversión de etanol a ácido acético por *Acetobacter aceti* y especies relacionadas (Ray y Daeschel, 1992). Es una sustancia inocua altamente soluble en agua; no existen límites oficiales para la ingesta diaria en el hombre. Es generalmente reconocido como seguro (GRAS) para su uso general (Davidson y Branen, 1993). Cuando se incorpora ácido acético a un alimento se expresan dos efectos, uno acidulante y otro preservativo. A concentración de 1.2 % sin disociar, inhibe casi toda la flora total dentro de límites razonables de carga inicial. Al 0.1% actúa sobre la mayoría de los patógenos y esporulados; al 0.5% tiene efecto sobre los hongos toxigénicos. La mayoría de las bacterias patógenas son susceptibles. *Acetobacter*, las bacterias ácido lácticas, algunos bacilos anaerobios, los hongos y las levaduras en general, muestran una tolerancia mayor a este ácido. El ácido acético ( $pK_a=4.75$ ) es generalmente un inhibidor más efectivo que el ácido láctico (Salminen y von Wright, 1993).

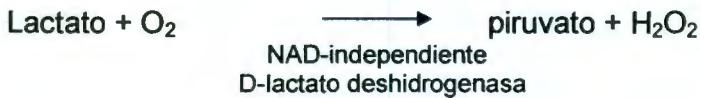
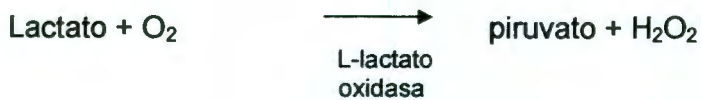
**Ácido propiónico:** es un ácido monocarboxílico, miscible en agua y su sal de sodio es más soluble que la sal de calcio (Davidson y Branen, 1993). De manera natural se genera durante la fermentación del queso Suizo por actividad de *P. freudenreichii*. A pesar de que las propionibacteria no son miembros de las bacterias ácido lácticas, juegan un papel muy importante en la fermentación de productos de cultivos lácticos. El ácido propiónico y sus sales de calcio y sodio son aprobadas como sustancias GRAS. Inhibe bacterias formadoras de esporas, especialmente *B. subtilis* a pH 6. A medida que el pH disminuye a 5 o 4, el ácido inhibe levaduras y hongos. El ácido propiónico y sus sales de calcio, sodio o potasio se emplean principalmente para controlar la actividad de hongos en productos de panadería (pan filante por especies de *Bacillus*) y quesos.

**Ácido láctico:** es uno de los más utilizados en alimentos. Puede utilizarse para acidificar, para mejorar el sabor y para inhibir el crecimiento de microorganismos (Davidson y Branen, 1993). Se puede obtener de la fermentación de la dextrosa por especies de *Lactobacillus* (Ray y Daeschel 1992). Es aprobado como sustancia GRAS, al igual que el

lactato de potasio, calcio y de sodio (Davidson y Branen, 1993). Su capacidad inhibitoria se debe a la reducción del pH a niveles a los cuales las bacterias no pueden iniciar su crecimiento. El ácido láctico es un excelente inhibidor de bacterias formadoras de esporas a pH 5 pero no es efectivo contra levaduras y hongos (Davidson y Branen, 1993). El ácido láctico es 4 veces más efectivo que los ácidos málico, cítrico, propiónico o acético en cuanto a la limitación del crecimiento de *Bacillus coagulans* en jugo de tomate (Davidson y Branen, 1993). El ácido láctico es más inhibitorio para *Mycobacterium tuberculosis* al disminuir el pH. (Davidson y Branen, 1993). La sal del ácido láctico también ha sido utilizada exitosamente como agente antimicrobiano. El lactato ha sido utilizado con otros compuestos en estudios de barrera múltiple. Una combinación de ácido láctico a una concentración de 25-30 mEq con nitrito de sodio, sorbato de potasio y monolaurato de glicerol aumentan la inhibición del crecimiento anaeróbico de *S. aureus* (Davidson y Branen, 1993). El ácido láctico se utiliza en la manufactura de jaleas, helados, productos de confitería y bebidas (Davidson y Branen, 1993).

**Peróxido de hidrógeno:** es un agente oxidante que tiene muchas aplicaciones en la industria de alimentos, incluyendo su uso como agente de blanqueo, como agente modificante del almidón, como conservador y como agente antimicrobiano. La FDA permite su uso como sustancia GRAS en leche (0.05%), suero (0.04%), almidón (0.15%) y jarabe de maíz (0.15%). La actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno se incrementa dramáticamente al elevar la temperatura. Tiene la propiedad de tener productos de degradación inocuos ( $H_2O + O_2$ ) además de ser activo a concentraciones relativamente bajas. Es un efectivo antimicrobiano debido a su potencial oxidante. El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno es debido a la generación de una especie tóxica (radical hidroxilo) por medio de una reacción del peróxido de hidrógeno con el ion superóxido, éste último formado por la reducción del oxígeno molecular. El radical hidroxilo, el cual es muy reactivo, reacciona inmediatamente y causa daño de componentes celulares tales como lípidos de membrana y DNA. Muchas bacterias fermentativas, incluyendo las BAL, producen peróxido de hidrógeno como un mecanismo de autodefensa contra la toxicidad del oxígeno. Las células productoras de peróxido de hidrógeno se protegen así mismas degradándolo enzimáticamente con catalasas, NADH peroxidasas, pseudocatalasas o por secreción y dilución al ambiente a niveles no tóxicos (Ray y Daeschel, 1992). El peróxido de hidrógeno es más activo contra anaerobios debido a su deficiencia en la generación de catalasa, la cual es capaz de destruir el peróxido.

También, su actividad es más significativa contra bacterias Gram negativas que bacterias Gram positivas. Basado en unos estudios se observó que el peróxido de hidrógeno inhibe el crecimiento de bacterias a una concentración de 25 ppm y es esporicida a 30,000 ppm a pH 5 (Davidson y Branen, 1993). El género *Lactobacillus* tiene la habilidad de generar peróxido de hidrógeno durante el crecimiento por diferentes mecanismos:



La acumulación del peróxido de hidrógeno en el medio de crecimiento puede ocurrir ya que los *Lactobacillus* no poseen la enzima catalasa (Daeschel, 1989).

**Diacetilo (2,3-butanediona):** es un producto final metabólico de las BAL que es sintetizado a partir del metabolito intermediario piruvato (Daeschel, 1989). Algunas cepas de *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* producen dicho compuesto (Davidson y Branen, 1993). El diacetilo es mejor conocido por su aroma butírico que imparte a productos lácteos. También se encuentra en vinos blancos, brandy, café tostado, ensilado y otros alimentos fermentados. En alimentos, el diacetilo es importante no sólo por ser el responsable de sabores deseables en los alimentos, sino también por su propiedad antimicrobiana (Ray y Daeschel, 1992). En un estudio se demostró que es inhibitorio a niveles de 200 µg/mL para levaduras y bacterias Gram negativas y niveles de 300µg/mL para bacterias gram positivas no lácticas (Daeschel, 1989). El diacetilo inhibe la utilización de arginina reaccionando con sitios de unión de la arginina en las proteínas de las bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas son más resistentes debido a su falta de proteínas de unión periplásmicas similares (Davidson y Branen, 1993). A pesar

de que el diacetilo es reconocido como seguro (GRAS), su uso como conservador de alimentos es limitado debido a que se requieren de grandes cantidades para que logre tener su efecto. Se sugiere que el diacetilo puede emplearse como una solución de inmersión antimicrobiana para utensilios y superficies de trabajo debido a su alta volatilidad (Daeschel, 1989).

**Reuterina:** es una sustancia producida por el microorganismo heterofermentativo obligado *Lactobacillus reuterii*, es de bajo peso molecular, no es de origen proteico, altamente soluble. Es un agente antimicrobiano de amplio espectro contra ciertas bacterias Gram positivas y negativas, levaduras, hongos y protozoos. Microorganismos de interés a la salud que son inhibidos por reuterina incluye las especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Trypanosoma*. Se ha propuesto que la reuterina o el lactobacilli productor de reuterina tengan aplicación en la conservación y procesamiento de alimentos (Daeschel, 1989).

#### **2.2.4 Efecto combinado de agentes antimicrobianos**

A pesar de que actualmente el uso de antimicrobianos en combinación se utiliza actualmente en la industria, sus interacciones son generalmente poco caracterizadas. Cuando dos antimicrobianos se utilizan en combinación pueden ocurrir tres efectos. El primer efecto es el aditivo, que ocurre cuando el efecto combinado es igual a la suma de los efectos observados de los dos agentes evaluados por separado. El efecto aditivo ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no se mejora ni se reduce en presencia de otro agente. El segundo efecto que puede ocurrir es el sinérgico, que se observa cuando el efecto en combinación es mayor a la suma de los efectos observados de los dos agentes independientes. El sinergismo se refiere al incremento de un agente antimicrobiano cuando está en presencia de otro agente. El tercer efecto es el antagonismo, el cual ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida en presencia del segundo agente. Un método utilizado para visualizar las interacciones de combinaciones antimicrobianas es el isoblograma (Figura 3), el cual puede ser elaborado utilizando las concentraciones mínimas inhibitorias de las diferentes combinaciones de ambos compuestos antimicrobianos. Se grafican sólo aquellos puntos en los cuales no ocurre crecimiento del microorganismo diana. Si los dos compuestos son aditivos, la gráfica será una línea recta. El sinergismo es indicado por una desviación de la

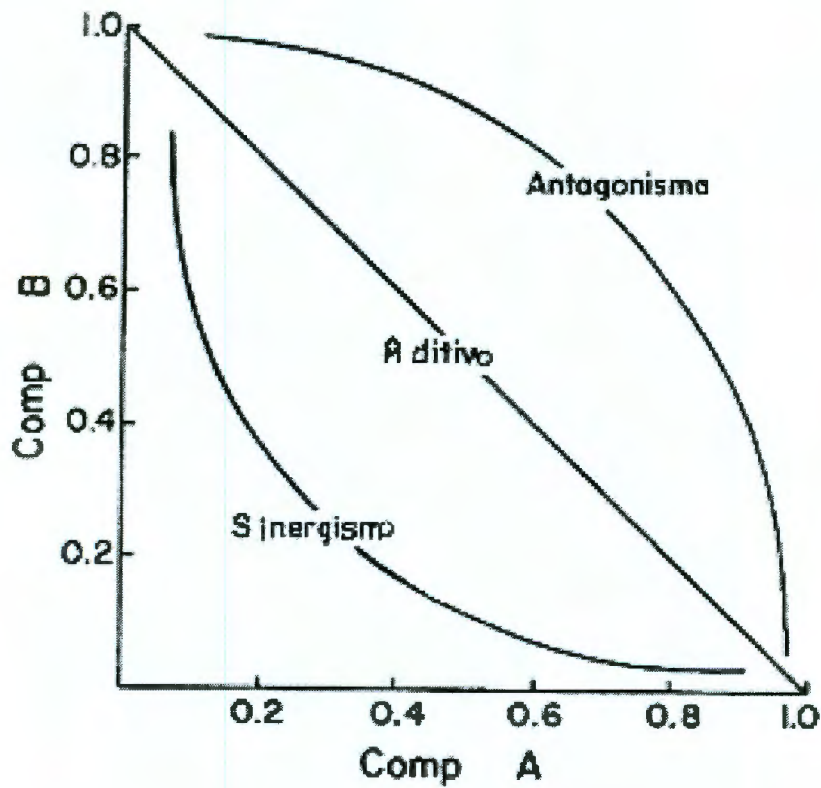
curva a la izquierda de la línea de aditividad (cóncava)), mientras que el antagonismo es una desviación de la curva a la derecha de la línea de aditividad (convexa) (Davidson y Parish, 1989).

### 2.2.5 Bacteriocinas

Las BAL producen varios compuestos antimicrobianos, dentro de los cuales se encuentran las bacteriocinas. El término bacteriocinas era designado originalmente a las proteínas del tipo colicina de *Escherichia coli* (Ray y Daeschel, 1992).

Se definen a las bacteriocinas como proteínas o complejos de proteína con actividad bactericida contra especies que son cercanamente relacionadas con el microorganismo productor. Además, las bacteriocinas son compuestos heterogéneos que varían en su peso molecular, en sus propiedades bioquímicas, en su espectro de actividad y mecanismo de acción (Salminen y von Wright, 1993). Los siguientes tres criterios se han utilizado para considerar un compuesto antimicrobiano de bacterias Gram positivas como una bacteriocina: (i) que sea una proteína biológicamente activa, (ii) que tenga un espectro inhibitorio reducido y (iii) que sea bactericida a cepas sensibles (Ray y Daeschel, 1992). En términos generales, algunas observaciones se han hecho acerca de la actividad antimicrobiana de bacteriocinas de bajo peso molecular : (i) algunas cepas dentro de una especie dada pueden ser sensibles o resistentes a una bacteriocina en particular; (ii) una cepa que parece ser sensible a una bacteriocina puede contener células que son resistentes; (iii) una cepa puede ser sensible a una bacteriocina mientras que puede ser resistente a una bacteriocina similar; (iv) células de una cepa que produce una bacteriocina puede ser sensible a otra bacteriocina; (v) las esporas de una cepa cuyas células son sensibles a una bacteriocina, presentan resistencia a la misma bacteriocina, pero se vuelven sensibles después de la germinación; (vi) bajo condiciones normales, bacterias Gram negativas no son sensibles a las bacteriocinas. Es interesante notar que las bacterias Gram negativas son solamente inhibidas por bacteriocinas al proveer condiciones que debiliten la integridad de la pared celular, tal como la presencia de agentes químicos (ácidos orgánicos, EDTA y otros quelantes) o por condiciones ambien-





**Fig. 3 Isoblograma** mostrando los tres tipos de posibles resultados de combinaciones de antimicrobianos. (Davidson y Parish 1989)

tales estresantes (pH, congelación, ligero calentamiento o altas presiones hidrostáticas (Cintas *et al.*, 2001). La heterogeneidad en el espectro antimicrobiano de las bacteriocinas permite clasificarlas en 3 grupos: (i) bacteriocinas con un estrecho espectro antimicrobiano, restringido a cepas dentro de especies relacionadas al microorganismo productor o a especies dentro del mismo género; (ii) bacteriocinas con espectro antimicrobiano intermedio, que inhiben otros géneros de BAL y bacterias Gram positivas, incluyendo patógenos como *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* ; (iii) bacteriocinas con amplio espectro antimicrobiano, que inhiben un amplio rango de bacterias Gram positivas que incluyen además de las mencionadas anteriormente a *Propionibacterium* spp. y *Bacillus* spp. Representativas de este grupo son nisina A y Z, que también inhiben desarrollo de esporas de *Clostridium* spp y *Bacillus* spp.; pediocina Ach/PA-1 y enterocinas L50 (Cintas *et al.*, 2001). Las características generales de las bacteriocinas se muestran en el cuadro 1.

#### 2.2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas

A pesar de su heterogeneidad fisicoquímica, las bacteriocinas poseen rasgos comunes que justifican su clasificación en tres clases bien definidas: (Cintas *et al.*, 2001):

- Clase I: Lantibióticos, péptidos policíclicos pequeños (menor a 5 kDa) que contienen aminoácidos no usuales y postransduccionalmente modificados.

Tipo A- moléculas enlongadas

Subtipo A1- péptido líder es hidrolizado por serín proteasa

Subtipo A2- péptido líder es hidrolizado por un transportador ABC

Tipo B- moléculas globulares

- Clase II: No lantibióticos pequeños (menor a 10kDa) estables al calor, que se dividen en los siguientes subgrupos:

Ila – bacteriocinas del tipo pediocina con actividad anti-*Listeria*.

Ilb – bacteriocinas de dos péptidos

Ilc – bacteriocinas sec-dependientes

Ild – bacteriocinas no incluidas en los grupos previos.

- Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (mayor a 30kDa) y termolábiles

Cuadro 1 Características generales de bacteriocinas (Ray y Daeschel, 1992).

Naturaleza química	Péptidos catiónicos hidrofóbicos; forman agregados; algunas presentan aminoácidos inusuales, especialmente lantionina.
Síntesis	Metabolito primario o secundario; ribosomalmente sintetizado; pueden contener modificaciones postraduccionales.
Determinantes genéticos	Codificados en plásmidos o en cromosoma.
Modo de acción	Bactericida; muy rápido; se une a receptores específicos de la pared celular; las productoras y muchas bacterias G(+) resistentes también las adsorben, pero son inmunes.
Espectro de actividad	Cepas específicas de bacterias G(+); cepas del mismo género o especie, cepas de diferentes géneros; bajo condiciones normales, las bacterias G(-) son resistentes.
Estabilidad	Propiedad bactericida para la mayoría es conservada después de un tratamiento a altas temperaturas; activas en un amplio rango de pH, pero más a pH ácido; la mayoría son estables varios meses durante el almacenamiento o congelación y después del secado.
Enzimas proteolíticas	La actividad se pierde por una o mas enzimas proteolíticas, incluyendo las proteasas gástricas.

La bacteriocina de la clase I más prominente es la nisina, la cuál es producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, aislada de leche y productos vegetales y también producida por *L. lactis* BB24 aislada de salsas fermentadas españolas (Cintas *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas de la clase II comprenden un grupo heterogéneo de bacteriocinas. La mayoría de las bacteriocinas clase II son pequeñas y son péptidos estables al calor con un alto contenido de pequeños aminoácidos como glicina. Por lo general son catiónicos y anfifílicos. Las bacteriocinas clase IIa han sido muy estudiadas las cuales tienen un fuerte efecto antimicrobiano contra Gram positivos esporulados y patógenos tales como *Listeria monocytogenes* que ha sido responsable de recientes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Las bacteriocinas clase II muestran un alto grado de secuencias conservadas, que es más pronunciado en la sección N terminal. A dicha clase pertenece la familia de las pediocinas, cuya primer bacteriocina caracterizada fue la Pediocina PA-1 y que es producida por cepas de *Pediococcus acidilacti* de origen cárnico. La mayoría de la bacteriocinas secretadas al medio muestran actividad antimicrobiana por si mismas, sin embargo las bacteriocinas de dos péptidos, clase IIb, requieren de la acción complementaria de dos péptidos para su completa actividad. Este grupo incluye a lactococcina G, lactacina F, lactococcina M, plantaricina S, plantaricina EF y JK y enterocina L50. La mayoría de las bacteriocinas descritas hasta ahora pertenecen a la clase II y se sintetizan como péptidos precursores (prebacteriocinas) que contienen una secuencia N terminal líder del tipo doble-glicina, la cual se elimina concomitantemente con la liberación al medio extracelular de la bacteriocina biológicamente activa mediante un transportador ABC-específico y su proteína accesoria. Por el contrario, las bacteriocinas sec-dependientes, identificadas recientemente, contienen un péptido señal N-terminal que dirige su secreción a través de la ruta general de secreción (clase IIc).

Las bacteriocinas clase III han sido identificadas dentro de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Éstas bacteriocinas a diferencia de la clase I y II, son inactivadas por tratamientos térmicos (60-100 °C, 10-15 min) y además no actúan en células sensibles por alteración de la membrana (Cintas *et al.*, 2001).

### 2.2.5.2 Bacteriocinas producidas por *Lactococcus*

El poder inhibitorio de *Lactococcus* fue reconocido en los 1930's. Se reportó la inhibición de cultivos iniciadores en queso comercial por bacterias lácticas similares. Ésta inhibición fue causada por proteínas inhibitorias. Desde aquel entonces hasta ahora, al menos cuatro tipos de bacteriocinas de *Lactococcus* han sido descritos: nisina, diplococcina, lactostrepcinas y lactococcinas. La bacteriocina de la clase I más prominente es la nisina.

Nisina: es un polipéptido ribosomalmente producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Contiene 34 amino ácidos y posee un peso molecular de 3500 daltones; sin embargo, usualmente ocurre como dímero con un peso molecular de 7000 (Salminen y von Wright, 1993). Contiene cuatro amino ácidos no usuales, dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB), lantionina y  $\beta$ -metil lantionina, los cuales forman enlaces tioéter para dar cinco anillos en la molécula (Ray y Daeschel, 1992). No contiene aminoácidos aromáticos por lo que no absorben a 280 nm (Davidson y Branen, 1993). La solubilidad y estabilidad de la nisina depende del pH de la solución. A pH ácidos es soluble mientras que a pH alcalinos y neutros es prácticamente insoluble (Davidson y Branen, 1993). A pH 2.5 en soluciones de HCl, la actividad de la nisina se mantiene estable por un largo tiempo, especialmente en refrigeración. Esto puede ser debido a la alta solubilidad a pH ácido. A medida que el pH aumenta arriba de 7, las moléculas sufren cambios irreversibles con pérdida de la actividad; a pH 11 la actividad se pierde completamente en 30 minutos a 63 °C. La actividad de la nisina en soluciones ácidas se mantiene estable aún después de calentar a altas temperaturas. Sin embargo, un 40% de pérdida ocurre a pH 5, y un 90% de pérdida ocurre a pH 6.8 después de esterilizar. En los alimentos, la pérdida de actividad es menor debido al efecto protector del alimento a la nisina. A temperaturas de refrigeración y almacenamiento la estabilidad se mantiene por un largo periodo (Ray y Daeschel, 1992). La nisina se inactiva por acción de proteasas como la pancreatina y la  $\alpha$ -quimotripsina, mientras que las siguientes enzimas proteolíticas no afectan su actividad: tripsina, eleastasa, carboxipeptidasa A, pepsina o erepsina (Salminen y von Wright, 1993). La nisina no tiene efecto inhibitorio contra levaduras, hongos o bacterias gram negativas, sin embargo, tiene efecto bactericida contra un amplio espectro de bacterias gram positivas como *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Ray y Daeschel, 1992).

La nisina también previene la formación de esporas e inhibe las células vegetativas de *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *C. butyricum*, *C. thermosaccharolyticum* y *C. botulinum*, ya que la presencia de nisina incrementa la sensibilidad al calor de sus esporas. En combinación con un agente quelante tal como lo es el EDTA, la nisina puede ser efectiva contra *Salmonella* y otros miembros de Enterobacteriaceae (Davidson y Branen; 1993).

En 1969, el Comité experto en aditivos alimentarios de la FAO/OMS le otorgó a la nisina la aceptación internacional para su uso como conservador de alimentos, dicho Comité recomienda que para que el uso de nisina en alimentos sea considerado aceptable, la ingesta diaria debe ser de 0-33,000 unidades/kg de peso corporal. Hay alrededor de  $40 \times 10^6$  unidades en 1 gramo de nisina pura. Generalmente se recomiendan dosis mayores de 400 unidades/g de alimento para la conservación de alimentos. En 1988, la FDA le otorgó a la nisina el status GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) (Davidson y Branen, 1993). La nisina ha sido aprobada en muchos países (entre ellos México) para su uso como conservador natural y para su principal aplicación comercial bajo las marcas Nisaplin® (Aplin & Barret Ltd, Trowbridge,UK), Chrisin® (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) y Ambicina® (Ambi, USA) en quesos procesados para inhibir el desarrollo de esporas (Davidson y Branen, 1993).

Diplococcina: En 1933, un agente antimicrobiano producido por *L. lactis* subsp. *cremoris* fue descubierto. Esta sustancia inhibitoria se nombró diplococcina, debido que la bacteria productora exhibía un arreglo diplococal. Posteriormente fue purificada, mostrando ser de naturaleza protéica. La diplococcina parcialmente purificada es estable a 100°C a pH 5 por al menos una hora, mientras que purificada pierde el 75% de su actividad bajo estas condiciones (Hoover y Steenson, 1993). En contraste con la nisina, la diplococcina no tiene aminoácidos atípicos como lantionina,  $\beta$ -metil lantionina, dehidroalanina dehidrobutirina. La diplococcina es sensible a tripsina, pronasa y  $\alpha$ -quimotripsina. El espectro de inhibición es limitado a cepas de *L. lactis* ssp. *lactis* y *L. lactis* ssp. *cremoris*. No es efectivo contra bacterias formadoras de esporas (Salminen y von Wright, 1993).

Lactostrepcinas: Se llevó a cabo un escrutinio de 67 lactococci no productores de nisina que tuvieran efecto inhibitorio contra streptococci a pH 4.6. Sólo 12 de 13 *L. lactis* ssp. *lactis* bv. diacetylactis y 1 de 17 *L. Lactis* ssp. *cremoris* produjeron esta inhibición. Los inhibidores fueron nombrados lactostrepcinas. El espectro de la actividad antimicrobiana incluía cepas de *Lactococcus*, *Streptococcus* grupos A, C y G, *Bacillus cereus*, algunos

*Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Cinco tipos de lactostrepcinas fueron identificadas basado en la actividad bactericida. El pH óptimo de actividad de las lactostrepcinas es 4.6-5.0, sin actividad a pH 7.0. Son sensibles a tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pronasa y fosfolipasa. El modo de acción de las 5 involucra la inhibición inmediata de RNA, DNA y síntesis de proteínas, sin embargo, esto es posterior a la alteración de membrana y pérdida de ATP intracelular y de iones  $K^+$  (Salminen y von Wright, 1993).

Lactococcinas: *L. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 y LMG2130 producen lactococcina A en la fase exponencial de crecimiento. La actividad es estable en las primeras 24 horas de la fase estacionaria. Las características de crecimiento de las dos cepas productoras son diferentes. Mientras que la cepa 9B4 sigue un crecimiento normal en la fase estacionaria, la cepa LMG2130 crece lentamente en dicha fase. Ambos, el extracto libre de células de LMG2130 y la lactococcina A purificada inhiben el crecimiento de lactococci. La lactococcina A es un pequeño péptido hidrofóbico de 54 amino ácidos, que específicamente inhibe el crecimiento de cepas de lactococci. El posible objetivo o blanco de su acción podría ser la membrana citoplasmática de células sensibles. La lactococcina B, fue purificada de una cepa recombinante conteniendo únicamente el gen *lcn B* [*L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (pMB580)] (Hoover y Steenson, 1993).

### 2.2.5.3 Mecanismo de acción

Las bacteriocinas poseen un modo de acción bactericida o bacteriostático en células sensibles, esta distinción siendo influenciada por diversos factores tal como la dosis de bacteriocina y grado de purificación, estado fisiológico de las células sensibles (fase de crecimiento) y condiciones experimentales (temperatura, pH, presencia de agentes que afectan la integridad de la pared celular y otros compuestos antimicrobianos) (Cintas *et al.*, 2001).

El mecanismo de acción de la nisina se elucidó en 1999 por Breukink *et al.*, al comparar la capacidad de formación de poros en la membrana celular de 2 antibióticos (vancomicina y magainina) y nisina. En la experimentación se observó que en la combinación vancomicina-nisina, el antibiótico inhibió el efecto de la nisina en cuanto a la capacidad de formar poros en la membrana. Al ser la vancomicina, un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular al unirse al motivo lys-D-ala-D-ala del precursor de la pared celular anclado a membrana (Lípido II), se logró elucidar que el mecanismo de acción de

la nisina utiliza como sitio de reconocimiento al mismo precursor de la pared celular, a Lípido II. Otra experimentación que afirma tal mecanismo fue la utilización de sistemas de membranas modelo compuestas de lípidos, en las que unas contenían Lípido II y otras no, y cuyos resultados observados fueron que en la ausencia de Lípido II, la nisina inducía la formación de poros sólo a concentraciones mayores de 1 $\mu$ M, mientras que en la presencia de Lípido II, la formación de poros se detectó a concentraciones de nisina de 1nM, lo que sugiere que la nisina tiene alta afinidad por Lípido II. También se observó experimentalmente que la nisina depende de concentraciones de Lípido II en un rango de 0.001-0.1 %mol, y esto sugiere por su parte que las diversas sensibilidades a la nisina de varias bacterias se deben a las diferentes concentraciones de Lípido II en sus membranas (Breukink *et al.*, 1999). El complejo nisina-Lípido II es una estructura muy uniforme y estable que consiste de 8 moléculas de nisina y 4 de Lípido II (Hasper *et al.*, 2004).

La formación de poros y la subsecuente pérdida de integridad de la membrana provoca la salida pasiva de pequeñas moléculas tales como iones (potasio y fosfato) y amino ácidos que resulta en una reducción de la fuerza protón motriz o al menos uno de sus componentes ( $\Delta\Psi$ , potencial de membrana;  $\Delta$ pH, gradiente de pH) (Cintas *et al.*, 2001). El nivel bajo intracelular de ATP y la ausencia de iones y cofactores resulta en la inhibición de la síntesis de macromoléculas tales como DNA, RNA, proteínas y polisacáridos que junto con la imposibilidad de mantener activo el transporte de nutrientes, permite la detención del crecimiento microbiano y la subsecuente muerte celular (Cintas *et al.*, 2001).

#### **2.2.5.4 Aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos**

Desde el punto de vista aplicativo, las bacteriocinas pueden ser utilizadas como:

- Inoculación del alimento con bacterias ácido lácticas que produzcan la bacteriocina en el producto (producción *in situ*).
- Adición de la bacteriocina purificada o semipurificada como conservador alimenticio.
- Uso del producto previamente fermentado con una cepa productora de bacteriocina que puede utilizarse como ingrediente en el procesamiento de alimentos. (Schillinger *et al.*, 1996).



En cualquier caso, el uso de las bacteriocinas en el aspecto costo-efectivo, requiere el uso de la tecnología de barreras múltiples que actúen sinérgicamente de manera combinada, éstas tecnologías pueden ser las tradicionales como la pasteurización, pH y conservadores o bien pueden ser tecnologías novedosas como el empaque de atmósferas modificadas, la alta presión hidrostática y los campos eléctricos pulsados (Cintas *et al.*, 2001). Además ha sido demostrado que la aplicación de combinaciones de diferentes bacteriocinas contribuyen a reducir la frecuencia a la que las poblaciones de bacterias desarrollan y para mejorar la calidad higiénica y la vida de anaquel de los alimentos (Cintas *et al.*, 2001).

En la aplicación de la nisina, se requieren de alimentos ácidos para asegurar la estabilidad tanto en el procesamiento como en el almacenamiento y que los microorganismos esporulados a controlar sean Gram positivos. Esto se refiere a la nisina A ya que la nisina Z tiene una mayor estabilidad en un amplio rango de pH incluyendo valores cercanos a la neutralidad. La nisina ha sido utilizada para prevenir la gasificación en queso suizo por *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum*. Después la utilizaron para conservar quesos procesados. En esta forma, la nisina se vendía en mezcla con leche descremada en polvo y fue aceptado y aprobado legalmente en muchos países europeos. Se llevaron a cabo pruebas con nisina en productos enlatados de salsa de tomate inoculados con *C. thermosaccharolyticum* y encontró que no se formaron las esporas cuando la nisina se utilizó en concentraciones de 200 UI/mL. Debido a que la nisina tiene un efecto antagonista importante contra muchos tipos de bacterias ácido lácticas pero no contra hongos, investigadores europeos examinaron el uso de nisina para la eliminación de bacterias lácticas de las bebidas alcohólicas. Se utilizó nisina para limpiar la cerveza contaminada por bacterias ácido lácticas, lo cuál es superior al lavado ácido tradicional para la inactivación de las bacterias lácticas ya que el tratamiento con nisina no altera los cultivos de *Saccharomyces* (Davidson y Branen, 1993).

Las BAL productoras de bacteriocinas tienen un gran potencial en la bioconservación de alimentos de origen natural, especialmente en alimentos mínimamente procesados, tales como ensaladas mixtas y verduras fermentadas. Se observó la reducción de una alta carga bacteriana en ensaladas listas para consumo al ser añadidas BAL productoras de bacteriocinas. Se observó que los coliformes y los enterococos fueron fuertemente reducidos o eliminados de los productos (Alzadora *et al.*, 2000). Alimentos a los cuales se aplica la nisina incluyen quesos, quesos procesados, frutas y vegetales enlatados, cremas

de confitería, leche, productos lácteos, carnes, productos de panificación y mayonesa. Ha sido aprobada en los estados unidos por la FDA para su uso en quesos para untar para inhibir el crecimiento de *C. botulinum* a un máximo de 250 ppm (Salminen y von Wright, 1993).

Actualmente se ofrecen comercialmente diferentes ingredientes elaborados a partir de bacterias ácido lácticas para mantener la frescura o incrementar la vida de anaquel de una variedad de alimentos como yoghurt, queso cottage, pasta, postres lácteos, helados y productos cárnicos tales como Microgard® (Rhodia) que es un producto elaborado de leche descremada grado A que ha sido fermentada por *Propionibacterium shermanii* y que después ha sido pasteurizada (Daeschel, 1989). Estudios iniciales demostraron que este producto prolonga la vida de anaquel del queso cottage por inhibición de bacterias psicrótrofas esporuladas. Microgard® ha sido aprobado para su uso por la FDA, y además ha sido estimado que alrededor del 30% de los quesos cottage producidos en Estados Unidos contienen Microgard®. Estudios recientes (Daeschel, 1989) han demostrado que Microgard® tiene efecto antagonista hacia la mayoría de bacterias gram negativas, algunas levaduras y algunos hongos pero sin efecto alguno hacia bacterias gram positivas. Dentro de estos estudios también se caracterizó su naturaleza química indicando la presencia de ácido propiónico, diacetilo, ácido acético y ácido láctico. Actualmente se observó que el componente inhibitorio es una sustancia de naturaleza protéica estable al calor y cuya actividad inhibitoria es inactivada por enzimas proteolíticas. La combinación del inhibidor, de los ácidos orgánicos y del diacetilo probablemente contribuye al efecto de conservación del Microgard® (Daeschel, 1989).

Otros ingredientes naturales producidos por fermentación utilizando suero, leche descremada, extracto de levadura o sólidos de jarabe de maíz son DuraFresh®, Alta® (1701, 1801, 2008, 2020, 2341) y Perlac® (1911,1912) (Quest Intl.) que mejoran las propiedades de sabor, textura y vida de anaquel de productos lácteos inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Bacillus*.

#### **2.2.5.5 Producción de bacteriocinas**

La producción de las bacteriocinas, normalmente se lleva a cabo en medios de cultivo complejos como son: de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), All Purpose con Tween (APT), Elliker, Infusión Cerebro Corazón (BHI), Extracto Triptona Glucosa (TGE), Caldo

Soya Tripticaseína (TSB) y Caldo de Soya Tripticasina con Extracto de Levadura (TSBYE). A pesar de que dichos medios originan gran crecimiento y relativamente altos niveles de bacteriocinas, su alto costo los hace no apropiados para su producción a gran escala. Además, algunos componentes del medio (proteínas, que no son totalmente consumidas por las cepas productoras al final de la fermentación) pueden interferir con la subsecuente purificación de las bacteriocinas. Por lo que es más adecuado el uso de materiales crudos como desperdicios o subproductos de la industria alimenticia, como una base de medio de cultivo. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo acerca de la producción de bacteriocinas en subproductos, por ejemplo la producción de nisina en melazas de azúcar, y la producción de mesenterocina 5, pediocina PO2, lactocina 705 y una mezcla de nisina/pediocina en suero. Estudios en medios complejos y en subproductos han demostrado que la producción de bacteriocina depende de la composición del medio. Esta dependencia es debido a la naturaleza cualitativa y cuantitativa de la fuente de nutrientes. Además, la composición misma del medio provoca diferentes valores de pH que también determinan el título de bacteriocinas (Guerra *et al.*, 2001).

### 2.3 Suero lácteo

Se dispone de una gran cantidad de suero proveniente de la producción de quesos y la manufactura de caseína. En la elaboración de queso se producen aproximadamente 9 kg de suero por cada kilogramo de queso, partiendo de 10 litros de leche. El suero tiene una proporción baja de proteínas, pero éstas poseen una calidad nutritiva superior a la de las caseína, huevo y soya. En nivel industrial, el suero se ha usado principalmente en forma deshidratada (secado por aspersion), para elaborar un gran número de alimentos. También se pueden eliminar sales y lactosa mediante el proceso de ultrafiltración, con lo cual se obtiene un producto con un contenido de proteína hasta de 75%. LA composición del suero lácteo se muestra en el Cuadro 2.

A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14,000 y 1,000,000 daltones y son solubles en un intervalo de pH muy amplio. Estas proteínas representan un 17% de las materias nitrogenadas de la leche de vaca. Constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina

sérica y las proteosas-peptonas. Sus propiedades químicas y fisicoquímicas se muestran en el Cuadro 3.

**$\beta$ -Lactoglobulina:** es la principal proteína del lactosuero; constituye alrededor de la mitad de esta parte. Existen probablemente tres variantes genéticas, A, B y C. A la temperatura ordinaria, la  $\beta$ -lactoglobulina de la leche no parece ligarse a otras fracciones proteicas; por el contrario, durante el calentamiento forma un complejo con la caseína (Alais, 1970) Es insoluble en agua destilada, soluble en soluciones diluidas de sales y precipitable por las altas temperaturas. Su grupo disulfuro le imparte características de estructura terciaria, y el sulfhidrilo libre la hace muy reactiva, de hecho, es la fuente más importante de sulfhidrilos en la leche.

**$\alpha$ -Lactoalbúmina:** es, por orden de importancia, la segunda proteína del suero y tiene actividad biológica ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa. No contiene grupos sulfhidrilos libres, pero sí cuatro disulfuros provenientes de cisteínas. Entre sus características se cuentan su bajo peso molecular y su alto contenido de triptofano (Badui, 1993).

**Inmunoglobulinas:** suman aproximadamente 10% del total de proteínas del suero; provienen de la sangre del animal, constan de moléculas de glucoproteínas con un alto contenido de grupos azufrados y con actividad biológica de anticuerpo (Badui, 1993).

**Sero albúmina:** esta fracción parece ser idéntica a la albúmina del suero sanguíneo (Alais, 1970). Sus principales características químicas son que contiene un alto número de cistinas y un grupo sulfhidrilo libre, y que es fácilmente desnaturizable aún a bajas temperaturas.

**Proteosas peptonas:** están compuestas por un grupo heterogéneo de fosfoglucoproteínas de pesos moleculares que varían de 4 mil a 200 mil daltones (Badui, 1999).

Algunas de las proteínas menores en el suero presentan propiedades biológicas importantes (Cuadro 4). Aunque en pequeñas concentraciones la lactoferrina, la lactoperoxidasa y la lisozima tienen actividad antimicrobiana, que combinada con los compuestos antimicrobianos producidos por la fermentación de *L. lactis*, puede incrementar su eficiencia en el aseguramiento de la calidad e inocuidad de los alimentos.

Cuadro 2. Composición del suero dulce (Badui, 1993).

	%
Sólidos Totales	6.5
Lactosa	4.9
Proteína	0.8
Nitrógeno no Protéico (% del total)	22.0
Ácido láctico	0.15
Cenizas	0.56
pH	6.2

Cuadro 3. Propiedades químicas y fisicoquímicas de las proteínas del suero (Harper, 2000).

Propiedad	$\beta$ - lactoglobulina	$\alpha$ - lactoalbúmina	Sero Albúmina	Inmunoglobulinas
Concentración en suero g/l	2-4	0.6-1.7	0.4	0.4-1-0
% de las proteínas en suero %w/w	56-60	18-24	6-12	6-12
Punto Isoeléctrico	5.2	4.2-4.5	4.7-4.9	5.5-8.3
Peso Molecular (Da)	18,400	14,000	66,000	> 146,000

Cuadro 4. Proteínas menores del suero (Harper, 2000).

Proteína	Concentración en suero g/l	% de proteínas del suero
Lactoferrina	0.006-0.10	0.09-1.4
Lactoperoxidasa	0.03-0.06	0.4-0.8
Lisozima	0.04-0.09	0.5-1.3
Glicomacropéptido de la caseína	0-1.5	0-20.0
Fosfopéptidos	Trazas	< 0.1
Proteínas globulares de membrana	0.05-0.2	0.75-2.8

## 2.4 *Listeria monocytogenes*

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995 la definición de *L. monocytogenes* es: Bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, móvil, aerobio, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia, catalasa positivo y oxidasa negativo.

Para su crecimiento, se requieren al menos 4 vitaminas B (biotina, riboflavina, tiamina y ácido  $\alpha$ - lipoico), también se requieren algunos aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina. La glucosa ayuda al crecimiento produciéndose L(+) ácido láctico.

En general, algunas cepas crecen en un rango de pH de 4.1 a 9.6 y en un rango de temperatura de 1°C a 45 °C (Jay, 2000). *Listeria monocytogenes* tolera elevadas concentraciones de sal en un amplio rango de pH. De particular importancia es que el microorganismo es psicrótrofo, capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (Alzadora *et al.*, 2000).

*Listeria monocytogenes* se encuentra comúnmente en suelo, agua, y ha sido aislada de una gran variedad de animales domésticos y silvestres. Las frutas y hortalizas pueden ser contaminadas del suelo o del abono utilizado como fertilizante. Los animales pueden estar infectados sin aparentar estar enfermos por lo que pueden contaminar alimentos de origen animal tales como carnes y productos lácteos. *Listeria monocytogenes* ha sido encontrada en alimentos crudos, tales como carnes no cocidas, verduras, frutas y productos lácteos elaborados a partir de leche no pasteurizada (CDC, 2001).

También se encuentra presente en una amplia diversidad de plantas (Cai *et al.*, 1997) y es localizada a menudo en ambientes de procesamiento de alimentos, o en las manos de los empleados (Cai *et al.*, 1997) así como formando biopelículas en equipos de la industria alimentaria (Cai *et al.*, 1997).

El potencial de contaminación en frutas y hortalizas es alto debido a la variedad de condiciones a los cuales dichos productos son expuestos durante su crecimiento, cosecha, procesamiento y distribución. Estas consideraciones actualmente adquieren gran significado a través de las nuevas técnicas de procesamiento que ofrecen atributos de conveniencia en respuesta a los cambios en los patrones de consumo y el incremento de la demanda de verduras frescas, frutas frescas y mínimamente procesadas.

*Listeria monocytogenes*, como se mencionó anteriormente, es ampliamente distribuida en vegetales. Las plantas y partes de las plantas utilizadas para ensaladas de verduras son

clave en la diseminación del patógeno de los hábitats naturales a los alimentos para consumo humano. *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración en muchas hortalizas crudas y procesadas tales como ensaladas listas para consumo, incluyendo col, apio, pasas, cebollas, ensalada de zanahoria, lechuga, pepino rábano, hinojo, berros, espárragos, brócoli, coliflor, papas pre-peladas empacadas al vacío entre otras (Alzadora *et al.*, 2000).

Un estimado de 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos se reportan cada año en los Estados Unidos. La CDC (Centers for disease control and prevention, por sus siglas en inglés) estima que en cada año hay 325 mil hospitalizaciones y 5 mil muertes de todas las enfermedades transmitidas por alimentos. *Listeria monocytogenes* ha sido reconocido como agente etiológico de enfermedades transmitidas en alimentos, con graves consecuencias a la salud (Mead *et al.*, 1999; IFT, 2002).

La información acerca de la incidencia de *L. monocytogenes* en frutas y verduras crudas y procesadas en América latina es limitada. En México se reportaron 6, 184,614 casos de enfermedades infecciosas intestinales en el año 2002 (SSA, 2002). Algunos brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos se muestran en el Cuadro 5.

Listeriosis, una infección causada por alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, ha sido reconocida como un problema grave a la salud en los Estados Unidos (CDC, 2001). La incidencia es de aproximadamente 2,500 casos anuales en los Estados Unidos y con una secuela estimada de 500 casos fatales por año. Se consideran 3 grupos sensibles de riesgo:

**Perinatal:** Este grupo incluye fetos y recién nacidos desde 16 semanas después de la fertilización hasta 30 días después del nacimiento. Son casos en los cuales la madre adquiere una infección alimentaria de *Listeria monocytogenes* durante el embarazo, exponiendo el feto al patógeno.

**Edad Avanzada:** Este grupo incluye personas mayores a 60 años. Este grupo es considerado susceptible a listeriosis, en parte por los cambios asociados con el proceso natural de envejecimiento.

**Edad Intermedia:** Debido a que existen suficientes datos para separar el resto de la población en personas susceptibles y sanas, este grupo incluye al resto de la población. Las personas sanas aparentemente no son sensibles a infecciones severas por *L. monocytogenes*. Sin embargo, existe ciertas subpoblaciones que son más sensibles, tales



Cuadro 5. Brotes de listeriosis en alimentos (CDC, 2001).

<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Casos/Muertes</b>	<b>Alimento involucrado</b>
Australia	1978-79	12/0	Verduras crudas
Estados Unidos	1979	20/3	Verduras crudas o queso
Canadá	1981	41/18	Ensalada de col
Estados Unidos	?	3/desconocido	Verduras congeladas
Estados Unidos	1985	142/48	Queso tipo Mexicano
Austria	1986	28/5	Leche no pasteurizada/verduras orgánicas
Inglaterra	1987-89	355/94	Paté
Francia	1992	280/63	Lengua de puerco
Estados Unidos	2002	46/7	Carne de pavo

como pacientes con sida, gente que consume medicamentos que suprimen el sistema inmune, personas con cáncer, diabetes o enfermedad del riñón, entre otros (CDC, 2001). Una persona infectada con *L. monocytogenes* usualmente manifiesta síntomas iniciales de fiebre, dolor muscular, y algunos síntomas gastrointestinales tales como náuseas y diarrea. Si la bacteria penetra al torrente sanguíneo puede ocurrir una septicemia. Si la infección se difunde al sistema nervioso, pueden ocurrir síntomas como dolor de cabeza, torticolis, pérdida del equilibrio o convulsiones (CDC, 2001). Cuando un recién nacido es infectado, los síntomas de listeriosis son los típicos de la meningitis y normalmente se manifiestan entre 1 y 4 semanas después del nacimiento. El tiempo usual de incubación en adultos es de 1 a varias semanas (CDC, 2001).

#### **2.4.1 Legislación sobre *L. monocytogenes***

Algunos países han establecido límites legales del número de microorganismos permisibles en alimentos, especialmente en alimentos listos para consumo. El gobierno de los Estados Unidos tiene la política más rígida en la cual *L. monocytogenes* ha sido designada como "adulterante". Esto significa que cualquier alimento listo para consumo que contenga este microorganismo se considera como adulterado siendo entonces el alimento objeto de retirada del mercado y/o de censura.

El requerimiento en los Estados Unidos es la ausencia del microorganismo en 50 g. La cero tolerancia generalmente se refiere a la ausencia del microorganismo en 25 g. La Comunidad Europea especifica una cero tolerancia en quesos suaves y la ausencia del microorganismo en 1 g de otros productos. Algunas directrices provisionales de alimentos listos para consumo en el Reino Unido establecen 4 grupos de calidad basados en el número de *L. monocytogenes*. No detectable en 25g es satisfactorio; mayor a  $10^2/25g$  es justamente satisfactorio;  $10^2-10^3$  es insatisfactorio; y mayor a  $10^3$  hacen el producto inaceptable. El punto de vista de Alemania con respecto a la cero tolerancia es que no sólo es irreal sino también innecesario, por lo que los alimentos los clasifican en 4 niveles de riesgo. Productos que contengan poblaciones mayores a  $10^4$  son automáticamente retirados del mercado. Francia requiere la ausencia de *L. monocytogenes* en 25g en aquellos alimentos destinados a individuos en riesgo (Jay, 2000). Por su parte en México según la NOM-143-SSA1-1995, se requiere la ausencia en 25 g de muestra.

## 2.5 Uso de las bacteriocinas y/o cultivos bacteriocinogénicos para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos.

El efecto inhibitorio de las bacteriocinas de BAL contra *Listeria monocytogenes* en varios sistemas alimenticios está bien documentado y sugiere que las bacteriocinas tienen potencial como bioconservadores para controlar o inhibir el crecimiento de éste microorganismo. Algunos estudios sobre la aplicación de las bacteriocinas y/o cultivos bacteriocinogénicos con actividad antilisterial en alimentos se muestran en el Cuadro 6.

En el estudio realizado por Benkerroum y Sandine (1988), se evaluó la sensibilidad de *L. monocytogenes* ATCC 7644 a la nisina en queso cottage esterilizado y no esterilizado a unas concentraciones de  $37 \times 10^2$  UI/mL y  $2.22 \times 10^3$  UI/g respectivamente. Observaron que no hubo presencia de *Listeria* a las 24h tanto a 37 °C como a 4 °C, independientemente de si el queso cottage estaba esterilizado o no. El inóculo inicial de la *L. monocytogenes* fue de  $0.35 \times 10^6$  células/g para ambos casos.

*Carnobacterium piscicola* LK5, es una cepa productora de bacteriocina aislada de carne molida y se estudió su potencial para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en varios alimentos refrigerados. Los alimentos utilizados fueron: leche UHT, alimento para perro enlatado, carne molida, carne molida irradiada, pollo, carne de cangrejo pasteurizada, crema de maíz enlatada y salchichas, todos éstos fueron inoculados con una población de  $10^3$  UFC/g de *L. monocytogenes* Scott A y con una población de  $10^4$  UFC/g de LK5. Se incubaron a 5 y 19 °C. El crecimiento de *L. monocytogenes* fue suprimido en la leche, en la comida de perro, en el cangrejo, en la crema de maíz y en las salchichas. La bacteria fue menos inhibida a 19 °C. *C. piscicola* LK5, fue más efectiva en aquellos productos donde la microflora nativa fue reducida ya sea por procesamiento térmico o irradiación. (Buchanan y Klawitter, 1992).

Choi y Beuchat (1994), evaluaron cuatro cepas productoras de bacteriocinas contra *L. monocytogenes* Scott A. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* 26-2 fue la que tuvo menor efecto, mientras que *Pediococcus acidilactici* M resultó tener la mayor zona de inhibición en agar. *Leuconostoc paramesenteroides* OX y *Lactobacillus sake* Lb 706 tuvieron un efecto intermedio. La adición de 10 mg de bacteriocina en polvo de *L. sake* a 150 g de kimchi (col fermentada) no presentó efecto en *L. monocytogenes*. Sin embargo, la misma cantidad de bacteriocina derivada de *P. acidilactici* tuvo un efecto letal y controló la población del patógeno durante los 16 días de la fermentación del kimchi.

Cuadro 6. Aplicación de bacteriocinas y/o cultivos bacteriocinogénicos con actividad antilisterial en alimentos

Bacteriocina y/o cultivo bacteriocinogénico	Patógeno(s)	Alimento(s)	Autor (es)
Nisina	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. saligery</i> .	Queso cottage	Benkerroum y Sandine, 1988.
<i>Carnobacterium piscicola</i> LK5	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Alimentos refrigerados	Buchanan y Klawitter, 1992.
<i>P. acidilactici</i> M	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Col fermentada	Choi y Beuchat, 1994.
Nisina	<i>L. monocytogenes</i> <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> .	Queso cottage	Ferreira y Lund, 1996.
Nisina	<i>L. monocytogenes</i>	Quesos tipo ricotta	Davies <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Enterococcus mundtii</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Frijol germinado	Bennik <i>et al.</i> , 1999.
<i>L. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Queso fresco de cabra	Benkerroum <i>et al.</i> , 2000.
Nisina	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Carne cruda	Ariyapitipun <i>et al.</i> , 2000.
Nisina	<i>L. monocytogenes</i>	Hortalizas cortadas	Leverentz <i>et al.</i> , 2003.

En 1996, Ferreira y Lund inocularon una cepa de *L. monocytogenes* resistente a nisina en queso cottage con un pH de 4.6-4.7. El número de células viables de *L. monocytogenes* disminuyó aproximadamente 10 veces durante el almacenamiento a 20 °C por 7 días. Sin embargo, al adicionar la nisina a una concentración de 2000 UI/g, la población disminuyó mil veces tan solo en 3 días.

Davies *et al.*, en 1997 determinaron la eficiencia de la nisina para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en quesos tipo ricotta durante un periodo de almacenamiento de 70 días a 6-8 °C. Los quesos fueron elaborados con leche no pasteurizada y a ésta se le incorporó la nisina. Antes del almacenamiento, los quesos fueron inoculados con un cocktail de 5 cepas de *L. monocytogenes* a una concentración de  $10^2$ - $10^3$  ufc/g. Los análisis de vida útil demostraron que la incorporación de nisina a niveles de 2.5 mg/L es efectiva para inhibir el crecimiento de la bacteria por un periodo de 8 semanas o más. Los quesos elaborados sin la adición de nisina, contenían una alta población de la bacteria durante la primera y segunda semana de incubación.

Dos cepas bacteriocinogénicas de *Pediococcus parvulus* y una de *Enterococcus mundtii* fueron evaluadas por su potencial para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en frijol germinado asiático almacenado en atmósfera modificada. Estas cepas fueron aisladas de hortalizas mínimamente procesadas. *E. mundtii* se evaluó en agar y en frijol en una atmósfera modificada (1.5% de O<sub>2</sub>, 20% de CO<sub>2</sub> y 78% de N<sub>2</sub>) a 8°C. El crecimiento de *L. monocytogenes* fue inhibido en agar pero no en el frijol germinado. Sin embargo se ha encontrado que la mundticina, la bacteriocina producida por *E. mundtii*, ha sido utilizada como un agente bioconservador en frijoles germinados en atmósferas modificadas cuando es utilizada en el proceso de lavado (Bennik *et al.*, 1999).

Otro estudio sobre la aplicación de las bacteriocinas fue realizado por Benkerroum *et al.*, en el 2000. Utilizaron una cepa de *L. lactis* productora de bacteriocina para controlar *L. monocytogenes* en Moroccan jben (queso fresco hecho con leche de cabra o vaca). Se observó mediante la técnica del botón que la BAL producía una bacteriocina diferente a nisina. El queso se fermentó con la bacteria productora y se inoculó con  $10^4$  o  $10^7$  UFC/mL de *Listeria*. Los resultados mostraron que el patógeno se redujo 2.7 unidades logarítmicas después de 30 h al utilizar el inóculo alto de *Listeria*. Para el inóculo de  $10^4$  UFC/mL, el patógeno fue completamente eliminado a las 24h. Además, el uso del cultivo iniciador productor de la bacteriocina, extendió la vida de anaquel del queso por 5 días.

Esta tecnología propuesta beneficiará a los productos lácteos mínimamente procesados elaborados a partir de leche sin pasteurizar.

Ariyapitipun *et al.*, en el 2000, empleó ácido poliláctico de bajo peso molecular y ácido láctico para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en carne empacada al vacío. También se utilizó nisina como una barrera adicional al crecimiento del patógeno. Los cubos de carne inoculada se sumergieron en soluciones de 2% de ácido poliláctico, 2% de ácido láctico, 400 UI/mL de nisina, o combinaciones de cada ácido y nisina por 5 min y se dejaron secar 15 min. Los cubos se empacaron al vacío y se almacenaron a 4°C por 42 días. El tratamiento de 2% ácido poliláctico, de 2% ácido láctico, de 2% nisina-ácido poliláctico, de 2% nisina-ácido láctico y de nisina a 400 UI/mL, mostraron un efecto bactericida inmediato contra *L. monocytogenes* con una reducción de 1.22, 1.56, 1.57, 1.94 y 1.64 unidades logarítmicas respectivamente, comparados con la población inicial de 5.33 log UFC/cm<sup>2</sup> del control al día cero.

Estos tratamientos combinados con el empaque al vacío y temperatura de refrigeración, inhiben exitosamente el crecimiento del patógeno durante el almacenamiento. Al final de los 42 días, la población de *L. monocytogenes* remanente en las muestras fue de 1.21, 0.36, 2.21, 0.84 y 0.89 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente.

Finalmente Leverentz *et al.*, en el 2003, encontraron que *L. monocytogenes* sobrevive con un ligero incremento en la población en manzanas red delicious cortadas y almacenadas a 10°C, pero en cambio encontraron que en melon cortado almacenado a 10°C durante 7 días, la población de *L. monocytogenes* incrementó significativamente. Además evaluaron el efecto de fagos líticos específicos de *L. monocytogenes* mediante 2 métodos de aplicación: por aspersion y por pipeteo. Estos fagos se evaluaron sobre *L. monocytogenes* inoculada en manzana y melon cortados. La mezcla de fagos redujo la población del patógeno de 2 a 4.6 unidades logarítmicas comparadas con el control en melon. En manzana, la reducción fue menor a 0.4 unidades logarítmicas. En combinación con la nisina, la mezcla de fagos redujo 5.7 unidades logarítmicas en rebanadas de melon y 2.3 unidades logarítmicas en rebanadas de manzana comparadas con el control. La nisina por sí sola reduce 3.2 unidades logarítmicas de *L. monocytogenes* en melon y 2 unidades logarítmicas en manzana. La aplicación de fagos por aspersion y la mezcla de los fagos-nisina reducen más la población de *L. monocytogenes* que por el otro método de aplicación.

## 2.6 Lechuga

La lechuga es una hortaliza muy común en varios países. Generalmente se consume cruda, especialmente en ensaladas y sandwiches. La producción y consumo de lechuga mínimamente procesada se ha incrementado dramáticamente en muchos países los últimos años. La conveniencia de la lechuga cortada, prelavada y empacada beneficia a los consumidores y ha creado la demanda de elaborar productos de alta calidad (Li *et al.*, 2002). Por consiguiente dichos productos representan un reto importante para los investigadores y productores para mantener sus propiedades sensoriales y garantizar su inocuidad.

De acuerdo a la FAO para el año 2002, la producción de lechuga a nivel mundial corresponde a 18, 754, 758 toneladas, de las cuales 4, 352, 740 ton son producidas por los Estados Unidos y 234, 572 ton por México (FAO, 2002).

En el año de 1986, la lechuga, el apio y tomates fueron los alimentos implicados en un brote de listeriosis en ocho hospitales de Boston (Li *et al.*, 2002).

Una gran variedad de desinfectantes químicos han sido utilizados para reducir las poblaciones de patógenos en frutas y hortalizas. El cloro es el más usado durante el lavado de estos productos, sin embargo, otros productos químicos han sido evaluados y utilizados como son: el dióxido de cloro, el peróxido de hidrógeno, los ácidos orgánicos, el fosfato trisódico y ozono. Pero, muchos de estos químicos tienen un efecto mínimo en la inactivación de patógenos en frutas y hortalizas. Por lo que tratamientos más eficaces para inactivar patógenos son requeridos (Park *et al.*, 2001).

En orden de garantizar la inocuidad de las hortalizas, se pueden proponer otro tipo de barreras, tales como competencia microbiana y bacteriocinas (Vescovo *et al.*, 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Basado en la investigación, se ha indicado que los microorganismos antagonistas y sus productos metabólicos tienen potencial para ser empleados para el control de microorganismos patógenos en alimentos. A la fecha, la nisina es la única bacteriocina que ha sido aprobada por la FDA para su uso en alimentos, sin embargo existen muchas otras bacteriocinas producidas por BAL que no han sido evaluadas y se requiere de mayor información al respecto. Antes de que una bacteriocina sea considerada para su aplicación en alimentos, se necesita conocer su espectro antimicrobiano, sus características bioquímicas, así como su eficiencia en modelos alimenticios. Otro factor importante a considerar es el aspecto económico al utilizar una bacteriocina en un alimento. Existen varias formas para que su aplicación sea costo-efectivo, entre ellas se encuentran: la determinación de los parámetros para su producción, su uso como un ingrediente en polvo que le confiera estabilidad, su uso en combinación con otros factores de conservación para lograr un efecto sinérgico o aditivo, y su producción en medios alternativos como es el caso del suero lácteo, el cual es considerado como un subproducto en la industria de alimentos.

Por otra parte, como resultado de brotes recurrentes y de las formidables características que posee *L. monocytogenes* (psicrótrofo, alta tasa de mortalidad, amplia distribución en el medio ambiente y resistencia térmica), las agencias regulatorias federales de los Estados Unidos y de México han adoptado la política de “cero tolerancia” de esta bacteria en alimentos listos para consumo.

Por consiguiente, el presente trabajo de investigación se basa en los criterios anteriormente mencionadas para lograr la obtención de un ingrediente antimicrobiano, que tenga efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes*.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Obtener un ingrediente antimicrobiano producido mediante fermentación sumergida de suero lácteo suplementado como medio de cultivo alternativo utilizando *Lactococcus lactis* UQ2, que inhiba el crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* UQ2 y de producción de la bacteriocina en suero lácteo suplementado.
2. Determinar las condiciones para obtener el ingrediente antimicrobiano en polvo.
3. Evaluar el efecto combinado de actividad antimicrobiana del ácido láctico y del ingrediente.
4. Comparar el efecto antimicrobiano del ingrediente en polvo con ingredientes semejantes de marcas comerciales.
5. Evaluar la eficiencia antimicrobiana del ingrediente contra *Listeria monocytogenes* Scott A en lechuga.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas

*Lactococcus lactis* UQ2: bacteria ácido láctica productora de bacteriocinas, aislada de un producto lácteo en la Universidad Autónoma de Querétaro.

*Micrococcus luteus* NCIB8166: cepa de colección utilizada como indicador de la actividad antimicrobiana, donada por la Universidad de Reading, Inglaterra.

*Listeria monocytogenes* Scott A: bacteria sobre la cual se evaluó el efecto antimicrobiano, donada también por la Universidad de Reading, Inglaterra.

### 5.2 Medios de cultivo

Suero ALGIL® : medio de crecimiento de *L. lactis* UQ2 y sin suplementar..

La composición del medio suplementado se muestra en el Cuadro 7.

Caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Oxoid; Basingstroke, Inglaterra): para la activación de *L. lactis* UQ2.

Agar MRS (Oxoid): para la verificación de pureza de *L. lactis* UQ2.

Medio Assay (Tramer y Fowler, 1964): para la conservación de *M. luteus* y para el ensayo de actividad antimicrobiana. Su composición se muestra en el Cuadro 8.

Caldo y Agar Soya Trypticaseína (Bioxon, Cuautitlán, México) con 0.6% de Extracto de Levadura (Bioxon): para el crecimiento y detección de actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

Listeria agar base selectivo (Oxford Formulation; Oxoid): usado para la cuenta viable de *L. monocytogenes*.

Listeria Suplemento Selectivo (Oxford Formulation; Oxoid): para el aislamiento de *L. monocytogenes*.

Cuadro 7. Composición del suero lácteo suplementado (Gómez, 2003).

<b>Ingrediente</b>	<b>Composición</b>
Suero lácteo ALGIL	10 g/L
Extracto de Levadura al 40% <sup>a</sup>	15 g/L
MgSO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	0.35 g/L
MnSO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	0.07 g/L
Tween 80 al 20% <sup>b</sup>	0.1 % v/v

<sup>a</sup> Bioxon, Cuautitlán, Edo. México

<sup>b</sup> Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.

Cuadro 8. Composición del medio Assay (Tramer y Fowler, 1964).

<b>Ingrediente</b>	<b>Composición</b>
Peptona <sup>a</sup>	10 g/L
Extracto de Carne <sup>a</sup>	3 g/L
Extracto de Levadura <sup>a</sup>	1.5 g/L
Cloruro de Sodio <sup>b</sup>	3 g/L
Azúcar Mascabado	1 g/L
Agar Bacteriológico <sup>a</sup>	1.5% y 0.8%

<sup>a</sup> Bioxon, Cuautitlán, Edo. México

<sup>b</sup> J.T. Baker, México.

### **5.3 Producción de bacteriocinas de *L. lactis* UQ2 en fermentador**

Basado en experimentos preliminares (Gómez, 2003), las condiciones utilizadas para la producción de bacteriocinas en el biorreactor fueron: el medio de cultivo (Suero lácteo suplementado) fue previamente saturado con aire durante 30 min para crear condiciones de microaerofilia durante la fermentación. El medio se inoculó con 1% v/v de un cultivo de 12 h de *L. lactis* UQ2, el cual creció con el mismo medio en un agitador orbital. Se tomaron muestras cada hora a lo largo del proceso de fermentación, cuya duración fue de 24 horas, para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos libres de células por el método de difusión en agar (Lewus y Montville, 1991). Para esta etapa se utilizó un biorreactor instrumentado Applikon con capacidad total de 3 L, equipado con un controlador (ADI 1030) y una consola (ADI 1035). En el biorreactor, la temperatura se controló a 30 °C y la velocidad de agitación fue de 200 rpm, el pH se monitoreó durante la fermentación.

### **5.4 Preparación del extracto libre de células (ELC)**

Las muestras obtenidas a diferentes intervalos durante la fermentación se calentaron a 80°C por 30 min para evitar la inactivación de las bacteriocinas por acción de proteasas. Las células se separaron por centrifugación a 10000 rpm (13000 x g) por 15 min a 4 °C (Bhunia *et al.*, 1988). Para eliminar el efecto de los ácidos orgánicos, el sobrenadante se ajustó a pH 6.5 con NaOH 1 M (Benkerroum *et al.*, 2000). Los ELC neutralizados, se filtraron por esterilización con membrana Millipore (México) de 0.45 µm (Bhunia *et al.*, 1988).

### **5.5 Ensayo de actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de los extractos libres de células se evaluó por el método de difusión en agar (Lewus y Montville, 1991). En 10 ml de medio Assay (1 % agar) se colocó una sobrecapa de 8 ml de medio Assay (0.8%) adicionado con 400 µl de tween 80 al 20 % e inoculado con 20 µl del microorganismo indicador *Micrococcus luteus*. Las cajas se dejaron solidificar a 4°C durante 1 hora y se hicieron pozos de 5 mm de

diámetro con un horador número 2, y el agar se removió. Cada pozo se llenó con 20  $\mu$ l de ELC en diluciones seriadas de dos en dos (Mayr-Harting *et al.*, 1972). Las placas se incubaron a 30°C durante 18-20 h. Una unidad de actividad (UA) se define como el recíproco de la máxima dilución donde se encuentre un halo de inhibición del microorganismo indicador, y se expresa por ml (Bruno y Montville, 1993).

## **5.6 Concentración del ELC**

El extracto libre de células resultante del proceso de fermentación, se secó por aspersión en un secador Buchi mini spray dryer B-191, para la obtención del ingrediente antimicrobiano en polvo. Se determinaron las temperaturas de entrada y de salida que permitieron conocer las condiciones experimentales a las cuales el producto se pudo recuperar en el secador.

## **5.7 Cinética de inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano en CST**

En medio de cultivo (CST + 0.6% de Extracto de Levadura) se inoculó una población de  $10^3$  UFC/mL de un cultivo de 18 h de *Listeria monocytogenes*, también se adicionó el ingrediente antimicrobiano a una concentración de 259,413 UA/g. Como control se inoculó un tubo del cultivo de *L. monocytogenes*. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37°C y a diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras para determinar la cuenta viable (Swanson *et al.*, 1992).

## **5.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ingrediente antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* Scott A**

Se determinó la CMI del ingrediente antimicrobiano para lograr la inhibición de *L. monocytogenes* Scott A en medio de cultivo (CST + 0.6% EL). Para esto, concentraciones crecientes del ingrediente antimicrobiano se colocaron en tubos con el medio de cultivo y se inocularon con una población de  $10^3$  UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A.

Los tubos se incubaron durante 24 h a 37°C, y la inhibición de la población de *L. monocytogenes* Scott A se determinó por medio de la cuenta viable (Swanson *et al.*,

1992) en AST. La CMI se define como la mínima concentración que dé ausencia completa de crecimiento después de la incubación (Ferreira y Lund, 1996).

### 5.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ácido láctico frente a *L. monocytogenes* Scott A

Se determinó la CMI del ácido láctico para lograr la inhibición de *L. monocytogenes* Scott A en medio de cultivo (CST + 0.6% EL). Para esto, concentraciones crecientes del ácido láctico se colocaron en tubos con el medio de cultivo y se inocularon con una población de  $10^3$  UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A.

Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C, y la inhibición de la población de *L. monocytogenes* Scott A se determinó por medio de la cuenta viable (Swanson *et al.*, 1992) en AST. La CMI se define como la mínima concentración que dé ausencia completa de crecimiento después de la incubación (Ferreira y Lund, 1996).

### 5.10 Efecto combinado de dos compuestos antimicrobianos: Ingrediente en polvo y ácido láctico.

Para determinar la actividad antimicrobiana de 2 compuestos en combinación se realiza primero una tabla donde se registran las combinaciones del ingrediente y el ácido láctico. La tabla se muestra a continuación:

Cuadro 9. Combinaciones del Ingrediente y el Ácido Láctico.

Concentración de Ingrediente (g/L) ↓	Concentración de Ácido Láctico (g/L) ⇒				
	0	0.75	1.0	2.0	2.5
0	0/0	0.75/0	1.0/0	2.0/0	2.5/0
64,853	0/64,853	0.75/64,853	1.0/64,853	2.0/64,853	2.5/64,853
129,706	0/129,706	0.75/129,706	1.0/129,706	2.0/129,706	2.5/129,706
259,413	0/259,413	0.75/259,413	1.0/259,413	2.0/259,413	2.5/259,413
389,120	0/389,120	0.75/389,120	1.0/389,120	2.0/389,120	2.5/389,120

Las CMI de todas las combinaciones se grafican para formar el isoblograma (Davidson y Parish, 1989) y determinar así el efecto combinado contra *Listeria monocytogenes* Scott A en CST. Se realizaron cada una de las combinaciones en tubos con el medio de cultivo y se inocularon con una población de  $10^3$  UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A.

Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C, y la inhibición de la población de *L. monocytogenes* Scott A se determinó por medio de la cuenta viable (Swanson *et al.*, 1992) en AST. La CMI se define como la mínima concentración que dé ausencia completa de crecimiento después de la incubación (Ferreira y Lund, 1996).

### **5.11 Comparación con ingrediente comercial**

Se comparó la eficiencia de la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* Scott A del ingrediente antimicrobiano (CST + 0.6% EL) con Durafresh 5005™ (Quest Intl.), un ingrediente de marca comercial que posee características de aplicación similares. Durafresh 5005™ es elaborado a partir de un proceso de fermentación láctea. Su composición la declara el proveedor como: ácidos orgánicos, péptidos y otros ingredientes naturales.

Se utilizaron diferentes concentraciones de ambos productos. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37°C y a diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras para determinar la cuenta viable (Swanson *et al.*, 1992).

### **5.12 Electroforesis en Sistema Tris-Tricina e identificación de la banda con actividad.**

Soluciones de extractos de células (EC) se analizaron por electroforesis en sistema tris-tricina de acuerdo con el protocolo de Ausubel *et al.*, (1995) basado en Schägger y von Jagow (1987). Dicho método utiliza un gel separador (acrilamida-bisacrilamida 16.5 % T, 6 C) y un gel concentrador (4 % T, 3 C). La muestra y los marcadores se prepararon con Tris-HCl/SDS (pH = 8.45) y se inyectaron 10 µl en cada carril. Se emplearon estándares de peso molecular (Polypeptide, SDS-PAGE, Biorad). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical Mighty small SE25. La electroforesis se corrió a 30 V los primeros 20 min para el alineamiento y en seguida se aumentó a 150 V por 1.5 h más para la separación. El gel se tiñó con azul de Coomassie G-250 (Serva, E.U.A).

De acuerdo al procedimiento descrito por Yang et al. (1992), una fracción del gel se lavó con agua desionizada estéril y se cortaron las bandas tomando como referencia la fracción teñida del gel. En una caja Petri se añadió 0.8 % de medio Assay inoculado con *M. luteus* ( $10^6$ - $10^7$  UFC/mL). Se incubó a 30°C por 24 h para posteriormente observar las zonas de inhibición alrededor de las bandas del gel.

### **5.13 Cinética de inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A en lechuga**

Se evaluó el efecto del ingrediente antimicrobiano sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A en lechuga romana.

#### **Lechuga Romana**

La lechuga utilizada en este estudio fue adquirida en un mercado local y se mantuvo en refrigeración hasta su uso para la experimentación. Inicialmente se le quitaron las hojas externas y las dañadas (Francis y O'Beirne, 2001), y se cortó en piezas de 5 cm x 5 cm. (Delaquis *et al.*, 2002). Posteriormente, la lechuga se sometió a un lavado con agua destilada durante 2 min (Harp y Gilliland, 2003) y las piezas se secaron en campana de flujo laminar por 45 min.

#### **Preparación del inóculo**

Se utilizó una cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A, la cuál fue reactivada en 3mL de CST + 0.6% EL y se incubó estáticamente a 37°C durante un tiempo de 18 – 24 h. Se realizaron al menos 3 activaciones previas a su uso. Posteriormente el cultivo se centrifugó 2 veces en solución salina (3000 rpm, 10 min); las células se resuspendieron en diluyente de peptona al 0.1% y se realizaron diluciones apropiadas para lograr tener un inóculo inicial de  $10^5$  UFC/g de lechuga.

#### **Procedimiento de inoculación**

Cien microlitros de la suspensión de células se inocularon a cada pieza de lechuga (5 x 5 cm), colocando 5 gotas de 20 microlitros cada una. Las piezas de lechugas inoculadas se dejaron secar en una campana de flujo laminar durante 1.5 h (Park *et al.*, 2001)



## Tratamientos

Catorce piezas de lechuga se seleccionaron al azar para la aplicación de cada tratamiento. Los cinco tratamientos fueron: (a) grupo de lechugas sin tratamiento, control 1, (b) grupo de lechugas tratadas con agua destilada estéril, control 2, (c) grupo de lechugas tratadas con una solución de ácido láctico a una concentración de 2 g/L, (d) grupo de lechugas tratadas con una solución combinada de ácido láctico 2 g/L e ingrediente antimicrobiano a una concentración de 64,853 UA/g y por último el tratamiento (e) grupo de lechugas tratadas con una solución del ingrediente antimicrobiano a una concentración de 64, 853 UA/g.

La aplicación de los tratamientos se realizó con aspersores de vidrio estériles y se depositaron aproximadamente 350  $\mu$ L a cada pieza de lechuga (Leverentz *et al.*, 2003) a una distancia de 15 cm (Beuchat *et al.*, 1998).

Las muestras tratadas se colocaron en cajas de plástico que se almacenaron en refrigeración a  $6 \pm 0.3$  °C, tomándose muestras a diferentes tiempos: 0 (antes de los tratamientos), 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas.

## Análisis Microbiológico

Cada pieza de lechuga (1g) se tomó de la caja de plástico y se colocó en bolsas de plástico que contenían 9 mL de diluyente de peptona. Posteriormente se homogeneizó manualmente por un tiempo de 2 min. Se realizaron diluciones seriadas con diluyente de peptona y 100  $\mu$ L se sembraron por extensión en superficie en cajas con agar selectivo Oxford con la adición del suplemento selectivo para *Listeria* (Oxford Formulation; Oxoid). Las cajas se incubaron a 37°C durante 48 h. Cabe señalar que el límite de detección corresponde a 100 ufc/g.

## Análisis Estadísticos

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado y se realizaron 3 réplicas. La comparación de medias ( $\log_{10}$  UFC/g) entre tratamientos a diferentes tiempos de

almacenamiento se determinó usando la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) del paquete estadístico JMP4 versión 4.0.4 (2001).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Crecimiento de *L. lactis* UQ2 y producción de bacteriocina

Se determinó la cinética del crecimiento de la bacteria y de producción de bacteriocina durante la fermentación de *L. lactis* UQ2 en el medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado. Inicialmente se llevó a cabo la fermentación por 24 h para poder conocer el tiempo en el cual se obtuviera la mayor producción de bacteriocina. Como se puede observar en la Fig. 4, la bacteria es capaz de crecer en el medio alternativo propuesto, utilizando a la lactosa como principal fuente de carbono para formar ácido láctico (reducción de pH), principal producto de la fermentación ya que se trata de una BAL homofermentativa. En ésta gráfica también se observa que apesar de que la bacteriocina se produce durante el crecimiento de la bacteria, la relación con la biomasa no es proporcional, por lo que se considera que la producción de bacteriocina no está plenamente asociada al crecimiento. Aún así, parece ser que una mayor densidad celular facilita la mayor producción de bacteriocina. En un estudio realizado por Yang y Ray (1994), se determinó que bajo condiciones controladas de pH (5.9), la velocidad de producción de la nisina es paralela a la velocidad de crecimiento de *L. lactis* sp. *lactis*, ya que de acuerdo a los autores, el proceso postraduccional de transformación de la prenisina ocurre a altos valores de pH, es decir, se requiere de un mayor pH para la producción de nisina.

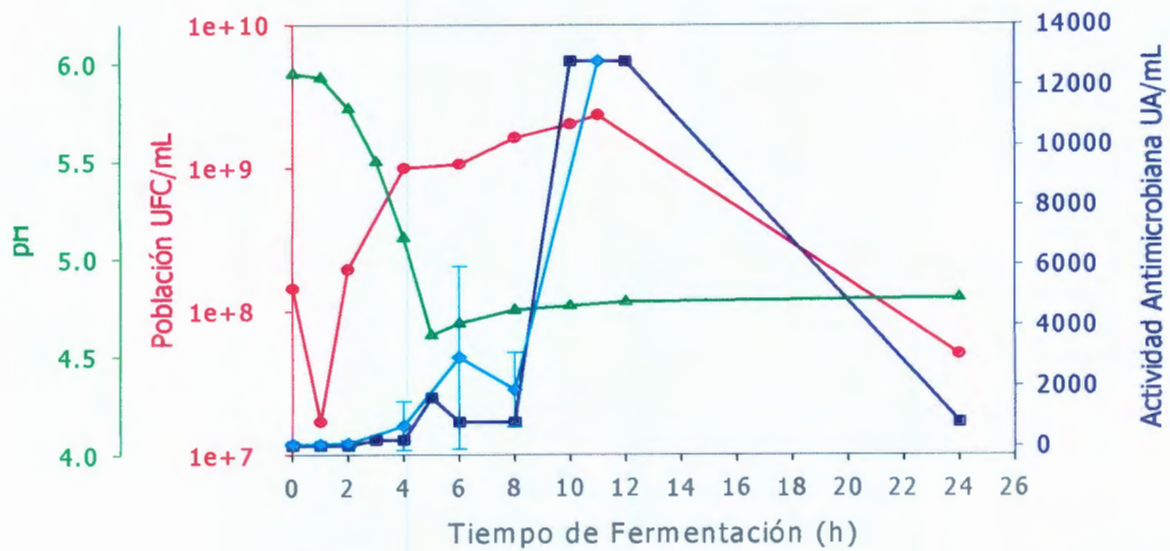
Al observar que el mayor título de bacteriocina ocurre entre las 10 y las 12 h de fermentación, se decidió detener el proceso a las 11 h. A este tiempo la actividad antimicrobiana obtenida fue de 12,800 UA/mL (Figura 5). En el estudio realizado por los autores mencionados anteriormente, la mayor producción de nisina en caldo TGE a 30°C ocurrió alrededor de las 9 h de fermentación, tiempo después de que la bacteria entró a la fase estacionaria.

Para poder cuantificar la actividad antimicrobiana de la bacteriocina se utilizó *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador, debido a que por el método empleado de difusión en agar con *Listeria monocytogenes* Scott A como indicador, los halos de inhibición no se formaron. En un estudio publicado por Morgan *et al.*, (2000) se realizaron sendos estudios en los cuales no se observaron halos de inhibición de una lacticina evaluada por dicho método, pero al realizar estudios de cinética en medio

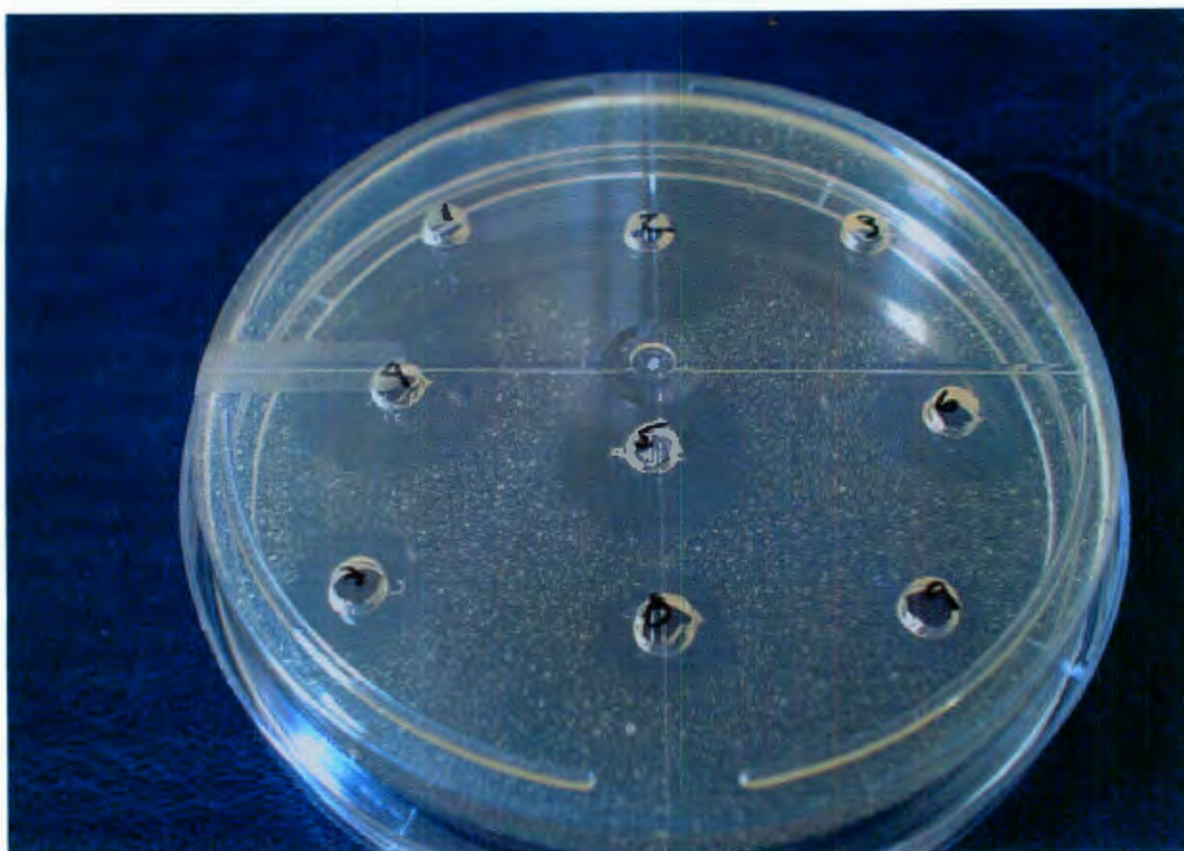
líquido se observó una actividad inhibitoria significativa. En otro estudio realizado por Morgan *et al.*, (2000), se determinó que por el mismo método no fue posible detectar actividad inhibitoria contra *L. innocua* ni *E.coli* al evaluar el producto de la fermentación del kefir, pero al utilizar otro método, que involucra un enriquecimiento junto con una prueba de inhibición, se detectó inhibición.

Al transcurrir las 24 h de la fermentación la actividad antimicrobiana de la bacteriocina disminuyó alrededor del 94%. Yang *et al.* (1992), postularon que esta disminución se debe a la adsorción de la bacteriocina a la célula productora cuando el pH del medio es apropiado (alrededor de 6). También consideraron que esta disminución podría deberse a la acción de enzimas proteolíticas producidas durante la última fase de crecimiento.

Los resultados de este estudio muestran que la producción de la bacteriocina está fuertemente influenciada por la composición del medio, el tiempo de incubación y por el pH. Además un sustrato simple y económico como lo es el suero lácteo puede ser utilizado para la obtención de un alto rendimiento de bacteriocina.



**Fig. 4** Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 y producción de bacteriocina en suero lácteo suplementado.



**Fig. 5.** Actividad antimicrobiana a las 11 h de fermentación del ELC utilizando *M. luteus* NCIB8166 como microorganismo indicador. La actividad en la dilución crítica (1:256) corresponde a 12, 800 UA/mL.

## 6.2 Obtención del ingrediente en polvo

El ELC resultante del proceso de fermentación, se secó en un mini secador por aspersion (Buchi, modelo B-191, Suiza), para la obtención del ingrediente antimicrobiano en polvo (Figura 6). Se probaron diferentes temperaturas para determinar las condiciones en las cuales el producto fuera más fácil de manipular en el secador y que además se obtuviera un polvo completamente fino. Los intervalos de la temperatura evaluados en la experimentación preliminar fueron: temperatura de entrada 170-180°C y para la temperatura de salida 65-80°C. Se eligieron finalmente como temperatura de entrada 180°C y como temperatura de salida 80°C, condiciones que cumplieron con las expectativas antes mencionadas. Silva *et al.* (2002), secaron por aspersion concentrados de células de BAL productoras de bacteriocinas a una temperatura de entrada de 200°C y a una temperatura de salida de 70°C, sin hacer referencia en base a que argumentos eligieron dichos parámetros y sin haber probado otras temperaturas.

Pero no sólo era importante el hecho de que se obtuviera un ingrediente en polvo de fácil manejo sino lo que se consideró más significativo fue lograr que la actividad antimicrobiana se mantuviera después del secado por aspersion. En el Cuadro 10, se muestra la actividad antimicrobiana después del secado por aspersion, cuyo rendimiento fue del 100 % debido a que no hubo pérdida de actividad y al concentrar el producto la actividad se incrementó notablemente. Una característica importante de las bacteriocinas es que pueden ser termoestables y este estudio demuestra que la bacteriocina producida por *L. lactis* UQ2 mantiene su actividad antimicrobiana después del secado a elevadas temperaturas, propiedad que la hace conveniente desde el punto de vista aplicativo, ya que puede emplearse durante el procesamiento de alimentos que impliquen el uso de altas temperaturas, ésta es otra forma de poder aplicar la bacteriocina en la tecnología de barreras múltiples para la conservación de alimentos.

La actividad antimicrobiana del ingrediente en polvo se evaluó nuevamente mediante la técnica de difusión en agar utilizando a *M. luteus* como microorganismo indicador, esto se muestra en la Figura 7.

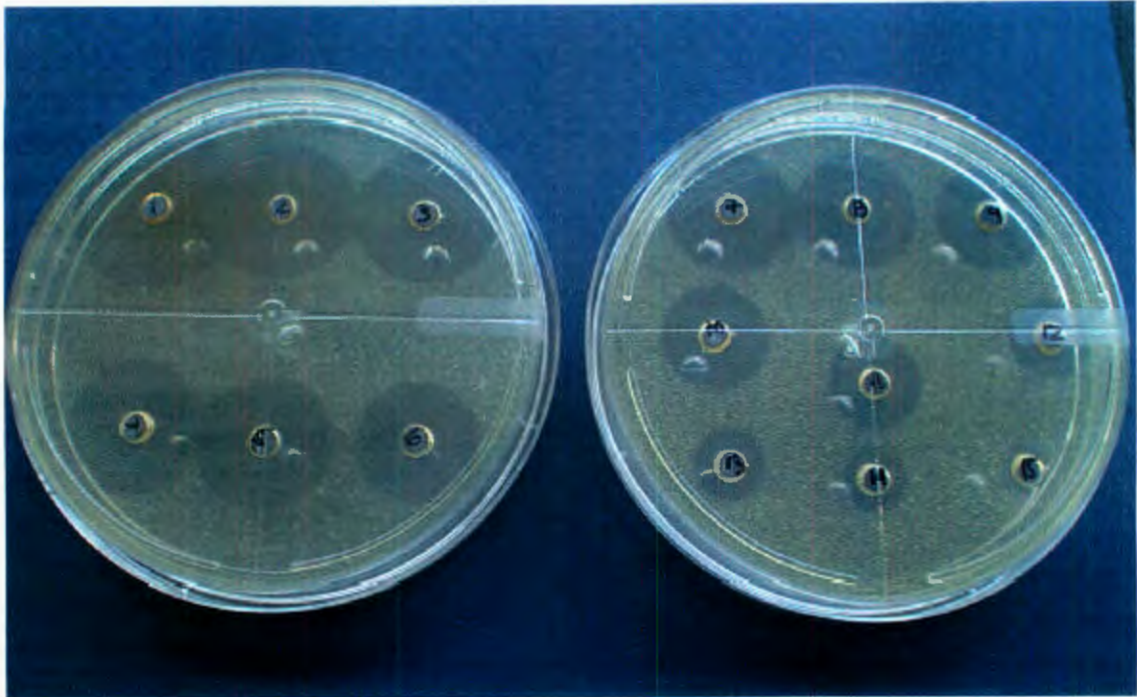


**Fig. 6.** Ingrediente antimicrobiano en polvo.



Cuadro 10. Actividad Antimicrobiana antes y después del secado por aspersión utilizando a *M. luteus* NCIB8166 como microorganismo indicador.

<b>Act. Inicial UA/g (Líquido)</b>	<b>Peso Inicial G</b>	<b>Act. Final UA/g (Polvo)</b>	<b>Peso Final g</b>	<b>Rendimiento de Actividad %</b>
12,738.9	1693.22	1,556,480	14.2	100



**Fig. 7** Actividad antimicrobiana del ingrediente antimicrobiano en polvo después del secado por aspersión utilizando *M. luteus* NCIB8166 como microorganismo indicador. La actividad en la dilución crítica (1:32,768) corresponde a 1, 638,400 UA/mL.

En el estudio de Silva *et al.* 2002, se evaluó si la actividad antimicrobiana se había perdido después del secado por aspersion de los concentrados de BAL. Ellos observaron la pérdida total de actividad contra *Staphylococcus aureus* de la BAL *Carnobacterium divergens*; sin embargo, se mantuvo su actividad frente a *Listeria innocua* y *L. monocytogenes*. Explicaron que éste fenómeno pudo deberse a la posible pérdida del plásmido responsable de la actividad inhibitoria. Sin embargo, el efecto antagonico de las BAL *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sakei* no se afectaron después del secado, ya que inhibieron el crecimiento de *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Considerando los informes anteriores y lo que ocurrió con la bacteriocina en este estudio, se concluye que la pérdida de actividad no puede ser generalizada y es recomendable que para cada microorganismo se investigue si ésta característica se mantiene. La aplicación de las bacteriocinas en la conservación de alimentos puede lograrse utilizando a la cepa productora de bacteriocina como cultivo *in situ*, utilizando a la bacteriocina purificada como aditivo o bien, el ELC concentrado como ingrediente. Por lo que desde el punto de vista comercial, un método económico para la producción a gran escala y de forma conveniente para la aplicación en alimentos es la obtención de un ingrediente antimicrobiano en polvo que mantenga su actividad después del secado por aspersion.

### 6.3 Cinética de inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano en CST

De acuerdo a los resultados anteriores, la actividad antimicrobiana del ingrediente concentrado contra *M. luteus* NCIB8166 no se vió afectada por el secado, sin embargo lo más relevante para nosotros era mantener la actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* Scott A después de éste proceso. Por lo que en este estudio se quiso evaluar si la actividad antimicrobiana contra este patógeno se conservaba. Como también ya fue mencionado, la cinética de inhibición se tuvo que realizar en medio líquido ya que en la prueba de difusión en agar no se observaron halos de inhibición. Los resultados de la inhibición de la población de *Listeria monocytogenes* Scott A al utilizar el ingrediente antimicrobiano a una concentración de 259,413 UA/g en CST con 0.6% de extracto de levadura (pH= 7.3) se muestran en el Cuadro 11 y en la figura 8.

Es importante observar que aunque el efecto no fue bactericida sino más bien bacteriostático, la disminución de la población en 0.5 h fue de 1.35 log UFC/mL aproximadamente, es decir, el efecto resultó ser casi inmediato. Esta inhibición se mantuvo hasta las 12 h para finalmente alcanzar una población de 4.5 log UFC/mL, mostrando así que la bacteria es capaz de recuperarse en estas condiciones, por lo que posiblemente se requiera de mayor concentración del ingrediente antimicrobiano para obtener su completa inhibición. La mayor inhibición fue de 7 ciclos logarítmicos a las 24h. Ennahar y Deschamps (2000) probaron la bacteriocina enterocina A en medio de cultivo TSBYE (pH = 6.5) frente a *Listeria monocytogenes* Lm 6 durante un tiempo de 12 h. En este estudio se observó que a mayor concentración de bacteriocina hubo mayor inhibición de la población, sin embargo no se logró alcanzar la completa inhibición de *Listeria monocytogenes* Lm 6.

El mismo comportamiento se muestra en un estudio realizado por Bhunia *et al.*, (1988), al evaluar el efecto antimicrobiano de pediocina AcH frente a *Lactobacillus plantarum* WSO-39 en caldo glucosa caseína (pH = 6.5) y a una concentración del 10%. Esta bacteriocina mostró un efecto bacteriostático, aunque la población aumentó una hora después de haberla aplicado.

Considerando los informes anteriores y lo ocurrido con la bacteriocina en nuestro estudio se concluye que las células sobrevivientes al utilizar altas concentraciones de bacteriocina posiblemente puedan adquirir resistencia a la misma.

Cuadro 11. Cinética de inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A en presencia del ingrediente antimicrobiano (259,413 UA/g) en CST.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Control (log UFC/mL)</b>	<b>Ingrediente Antimicrobiano (log UFC/mL)</b>
0	3.4067±0.0907	3.3300± 0.0520
0.5	3.6300± 0.0520	2.2867± 0.1106
1	3.5133± 0.0751	2.0100± 0.2771
1.5	3.7633± 0.0404	2.3133± 0.1504
2	3.7833± 0.3009	1.9533± 0.2434
3	4.2500± 0.1054	2.0533± 0.3213
6	4.7167± 0.2136	2.2567± 0.3092
9	5.6867± 0.0850	2.6267± 0.2836
12	7.4033± 0.0737	1.6900± 2.9802e-8
24	11.5867± 0.2608	4.5167± 0.1893



**Fig.8.** Cuenta en placa de *Listeria monocytogenes* Scott A en AST a las 6 h.  
Izquierda: Control; Derecha: Ingrediente Antimicrobiano 259,413 UA/g

#### **6.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ingrediente antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* Scott A**

En el estudio anterior se observó que el ingrediente antimicrobiano a una concentración de 259,413 UA/g no tuvo un efecto completamente inhibitorio contra *L. monocytogenes* Scott A, por lo que en este experimento se quiso encontrar la CMI la cual se define como la mínima concentración que da ausencia completa de crecimiento después de la incubación. Otra razón por la cual se determinó la CMI es porque posteriormente se realizaron estudios para evaluar el efecto de dos antimicrobianos en combinación sobre *Listeria*, requiriéndose para esa etapa la determinación de la CMI de cada antimicrobiano. Este experimento fue llevado a cabo de modo similar al experimento anterior (sección 6.3). Las concentraciones del ingrediente antimicrobiano evaluadas fueron: 290,542UA/g, 323,747.8 UA/g, 389,120 UA/g y 518,826.35 UA/g. Después de la incubación, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

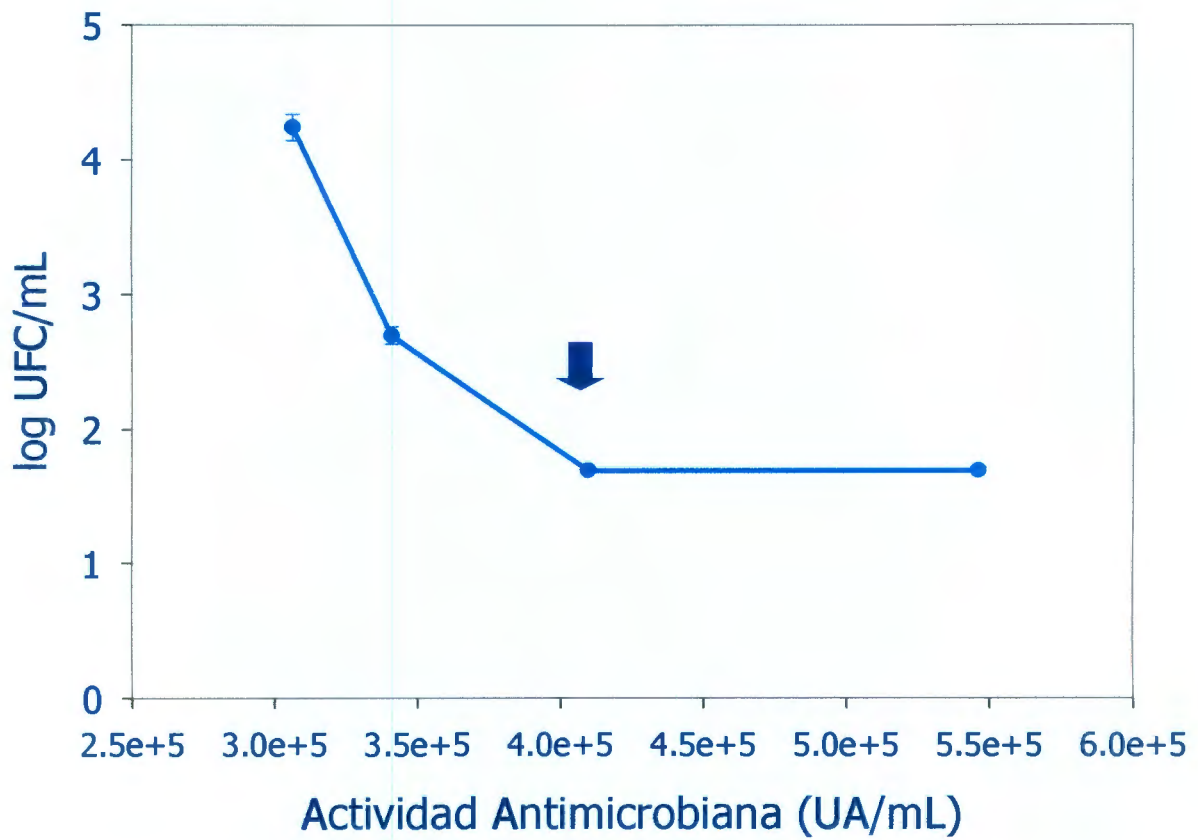
Se observa así, que la CMI del ingrediente antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* Scott A correspondió a 389,120 UA/g, concentración que es muy elevada ya que representa el 25% de la solución. Cabe mencionar que el límite de detección de esta técnica corresponde a 50 ufc/mL. De igual forma, este resultado nos dio pauta para realizar el estudio de antimicrobianos en combinación, ya que de esta forma podría reducirse la concentración del ingrediente antimicrobiano que en combinación con el ácido láctico (antimicrobiano evaluado en estudio de combinación) tuviera el mismo efecto inhibitorio.

Ferreira y Lund (1996) determinaron la CMI de la nisina frente a varias cepas de *Listeria*. Encontraron que en la mayoría de las cepas la CMI fue entre 1000-2000 UI/mL. Un factor importante realizado en este estudio fue que cambiaron el pH, observando así que a menor pH (5.5), la CMI era menor que a un pH alto (6.8) explicando que esto se debe principalmente a la solubilidad de la nisina a pH ácidos.

Otro estudio en el que se determinó la CMI de la nisina fue realizado por Benkerroum y Sandine (1988). Ellos probaron 2 tipos diferentes de agares: agar soya tripticaseína (pH=7.3) y agar MRS (pH=6.8) y sus resultados fueron que la CMI era menor en el agar MRS, debido a que a ese pH la nisina actúa mejor. Específicamente para *L. monocytogenes* Scott A la CMI en agar soya tripticaseína fue de 11,800 UI/mL.

Estos resultados fundamentan el hecho de haber obtenido una CMI alta, ya que el pH al cual se realizó esta prueba fue de 7.3, aunado al hecho de que *Listeria monocytogenes* Scott A una bacteria capaz de adquirir resistencia a la bacteriocina.





**Fig. 9.** CMI del ingrediente antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* Scott A en CST (pH = 7.3).

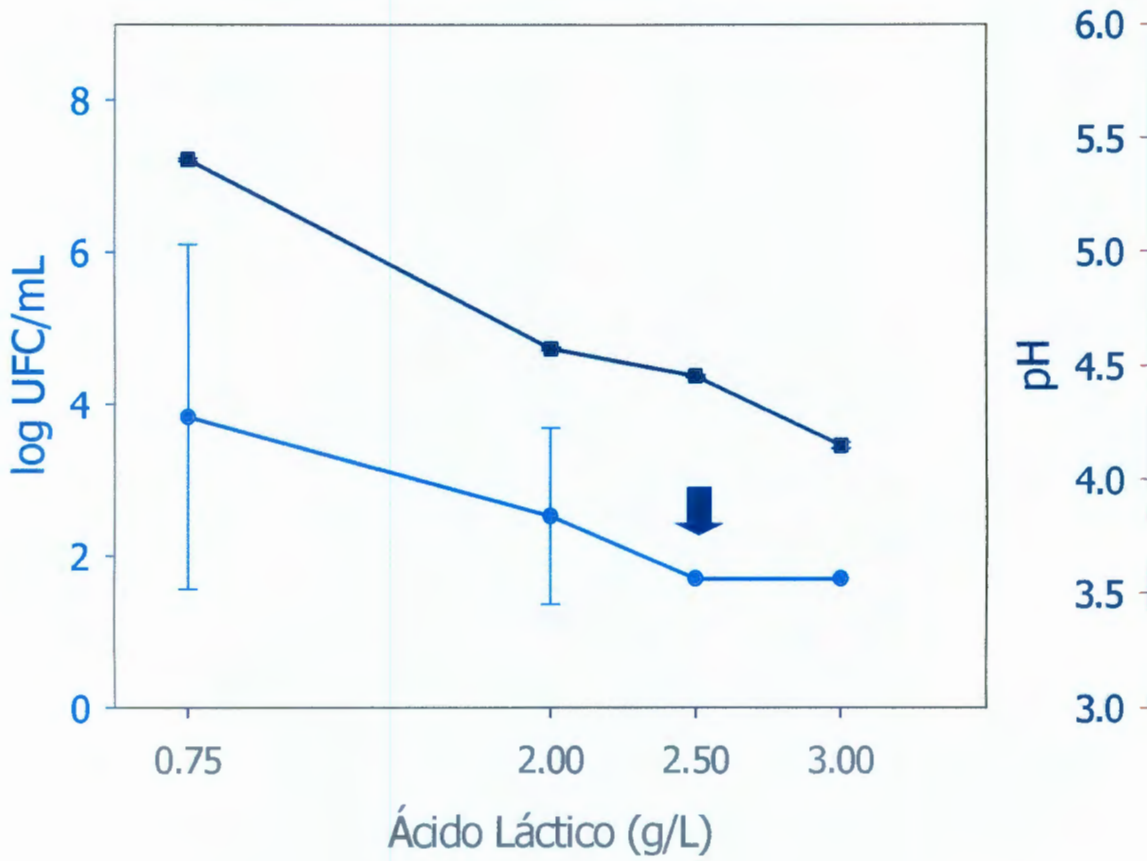
## 6.5 Determinación de la CMI del ácido láctico frente a *L. monocytogenes* Scott A

Esta parte experimental se llevó a cabo de igual manera que la determinación de la CMI del ingrediente antimicrobiano. Se realizó en medio de cultivo CST y con una población inicial de  $10^3$  UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A. Para poder llevar a cabo el estudio sobre el efecto de dos antimicrobianos en combinación se requiere conocer la CMI de cada uno de ellos. Las concentraciones de ácido láctico evaluadas fueron: 0.75 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 2.5 g/L y 3 g/L. Los resultados se muestran en la Figura 10, en la cual se ve que la CMI del ácido láctico frente a *Listeria* corresponde a 2.5 g/L, siendo importante mencionar que esta concentración proporciona un pH de 4.45.

Este valor de pH no difiere de lo establecido por Sorrells *et al.*, (1989), determinando que a niveles de pH de 4.4 a 4.6 de ácido láctico, el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es inhibido en caldo soya tripticaseína.

Es conveniente señalar que el efecto inhibitorio de los ácidos no sólo depende del valor de pH sino también de la concentración y tipo de ácido. El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se ejerce a través de la forma no disociada y este factor tiene mayor importancia que la bajada del pH por sí misma. La forma no disociada del ácido atraviesa la membrana plasmática del microorganismo y una vez en el interior, el ácido puede disociarse y afecta directamente al pH intracelular. Esto puede afectar a su metabolismo, ya que afecta al gradiente de protones y de carga con el exterior, e interfiere con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos. Además muchas enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pH's ácidos.

Se decidió trabajar con ácido láctico ya que se ha reportado su uso para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* tal es el caso de Sorrells *et al.*, (1989) y de Ariyapitipun *et al.*, (2000). La desventaja de dicho ácido es su bajo valor de pK el cual corresponde a 3.86, esto hace que su efecto antimicrobiano sea a dicho pH o incluso a valores menores ya que de esta forma el ácido se encuentra sin disociar. Por lo anterior, es preferible utilizarlo en alimentos ácidos.



**Fig. 10.** CMI del ácido láctico contra *Listeria monocytogenes* Scott A en CST

## 6.6 Efecto combinado de dos compuestos antimicrobianos: Ingrediente en polvo y ácido láctico.

Como se ha mencionado, el uso de agentes antimicrobianos en combinación se utiliza actualmente en la industria alimentaria pero sus interacciones son generalmente poco caracterizadas, esta es parte de la razón por la cual se llevó a cabo dicho experimento. Por otro lado resultados anteriores nos dieron pauta para llevarlo a cabo, ya que supusimos que de esta forma se podría reducir la concentración del ingrediente antimicrobiano al estar en combinación con el ácido láctico. Otro factor importante es que el costo de la nisina es mayor para aplicación a nivel industrial que las soluciones de ácido láctico como lo señala Ariyapitipun *et al* (2000).

Cuando dos antimicrobianos se utilizan en combinación tres efectos pueden ocurrir: sinergismo, aditividad o antagonismo, cada uno de los cuales se explicaron en la revisión bibliográfica correspondiente (sección 2.2.4). Las CMI's de los antimicrobianos de manera individual y en combinación se graficaron para formar el isoblograma.

Otra manera de evaluar el efecto de interacciones antimicrobianas es el uso de la concentración fraccional inhibitoria (CFI). La CFI es la concentración de cada antimicrobiano en combinación la cual produce inhibición de crecimiento expresada como una fracción de la concentración que inhibe el crecimiento cuando el antimicrobiano es utilizado individualmente, su ecuación es:

$$CFI = (CMI \text{ de antimicrobiano A en combinación} / CMI \text{ de A solo}) + (CMI \text{ de antimicrobiano B en combinación} / CMI \text{ de B solo}).$$

Si la CFI es < 1, la interacción es sinérgica, si la CFI = 1, la interacción es aditiva y si la CFI > 1 es antagónica (Branen y Davidson, 2004).

En la figura 11 se observa el isoblograma mostrando que el efecto de utilizar ambos agentes antimicrobianos fue aditivo. El efecto aditivo ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no se afecta ni se mejora al estar en presencia de otro agente. El resultado obtenido fue satisfactorio ya que se puede disminuir la concentración del ingrediente antimicrobiano obtenido en este trabajo al estar en combinación con el ácido láctico; por ejemplo se puede obtener el mismo efecto inhibitorio al utilizar 64,853 UA/g del ingrediente con 2.0 g/L de ácido láctico que

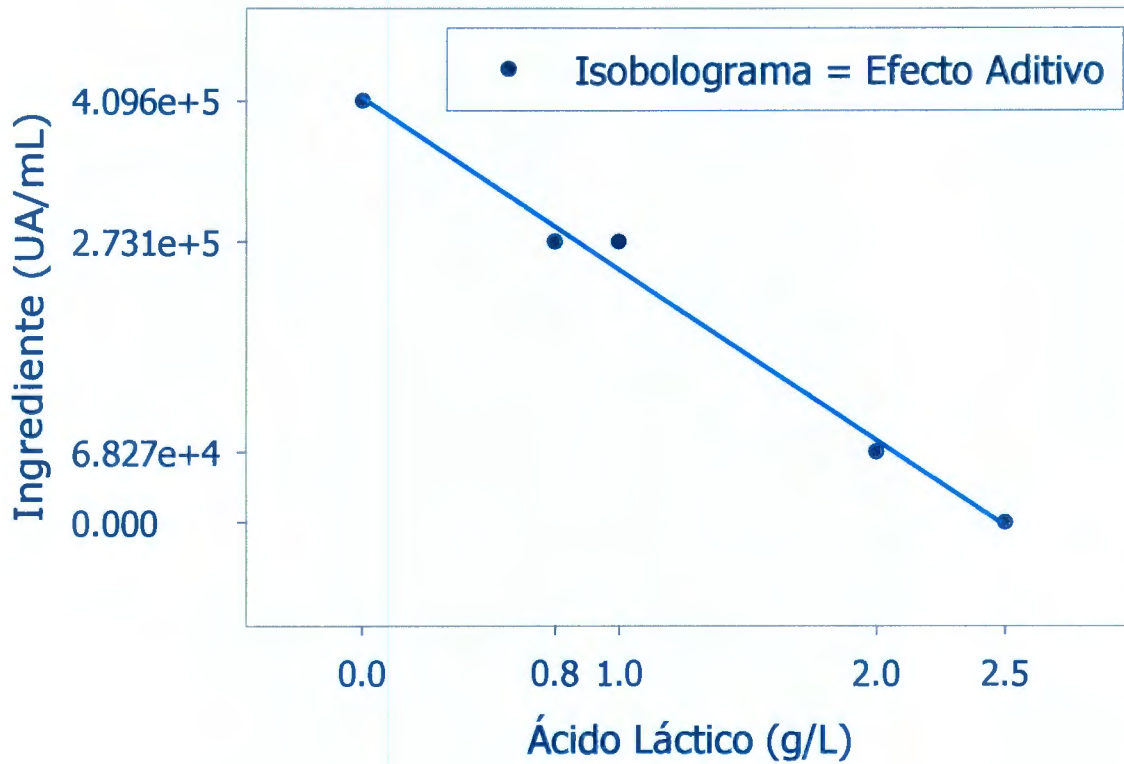
389,120 UA/g de ingrediente antimicrobiano por sí solo, representando así una disminución de 83% en la concentración.

Utilizando el método de la FIC, se confirma lo analizado en el isoblograma, obteniendo así una FIC = 1, indicando que el efecto es aditivo.

En un estudio realizado por Cleveland *et al* en el 2003, se evaluó en caldo soya tripticaseína el efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* Scott A del lactato de zinc, lactato de aluminio (0.1%), 100 UI/mL de nisina y de las respectivas combinaciones con nisina. Los resultados mostraron un efecto sinérgico entre las sales al estar en combinación con la nisina, concluyéndose que el catión fue el responsable del sinergismo, especulando que tanto el aluminio como el zinc interactuaban con la membrana facilitando la formación del poro de la nisina. Se tiene además la ventaja de que los lactatos de zinc y de aluminio son efectivos a bajas concentraciones y disminuyen el pH.

En el 2002, Mustapha *et al* realizaron un estudio para observar el efecto antimicrobiano al evaluar el efecto de 2% de ácido poliláctico, 2% de ácido láctico, 400 UI/mL de nisina y las combinaciones de cada ácido con nisina en carne cruda empacada al vacío. Estos autores no encontraron diferencia significativa en ninguno de los tratamientos argumentando que a esa concentración de nisina no se logró mejorar la actividad de los ácidos. En el estudio llevado a cabo por Branen y Davidson en el 2004, se determinó que la nisina inhibió a *L. monocytogenes* en una concentración de 7.8 µg/mL. También evaluaron el efecto combinado de la nisina con EDTA, los cuales actuaron sinérgicamente contra *L. monocytogenes* y *E. coli*. Los isoblogramas de este estudio mostraron que bajos niveles de EDTA mejora o potencia la actividad de la nisina en contra de *Listeria*, sin embargo, al elevar su concentración este efecto no se vió incrementado. El aporte fue que el EDTA logró disminuir la CMI de la nisina un 50%. Realizaron asimismo un experimento en leche UHT a 25 °C por 24h. Como resultado obtuvieron que combinaciones de nisina y EDTA no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Argumentando que esto sucede debido a que la nisina es menos activa al estar en un sistema de altas concentraciones de grasa.

La aplicación de bacteriocinas de BAL en combinación con métodos tradicionales de conservación y un adecuado procesamiento higiénico pueden ser efectivos para el control de microorganismos patógenos. Para esto se requiere de mayor estudio en las reacciones sinérgicas de estos compuestos en combinación con otros conservadores.



**Fig. 11.** Isobolograma de CMI's para la combinación del ingrediente antimicrobiano y ácido láctico en CST contra *Listeria monocytogenes* Scott A.

## 6.7 Comparación con ingrediente comercial

Se comparó la eficiencia de la actividad antilisterial del ingrediente antimicrobiano con un producto comercial obtenido mediante un proceso de fermentación láctea patentado. Este producto es conocido como Durafresh 5005™ (Quest Intl.) en cuya especificación no es señalado el espectro de acción aunque se declara su composición que es una mezcla de ácidos orgánicos, péptidos y otros ingredientes naturales.

La concentración a la cual se compararon ambos productos fue de 16% en CST, equivalente a 259,413 UA/g del ingrediente antimicrobiano. También se utilizó la CMI del ingrediente antimicrobiano correspondiente a 389,120 UA/g (409,600 UA/mL) y el control. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C y se tomaron muestras a las 0, 1, 3, 5, 8 11 y 24 h, para determinar la cuenta viable por el método de Miles-Misra (Swanson *et al*, 1992)

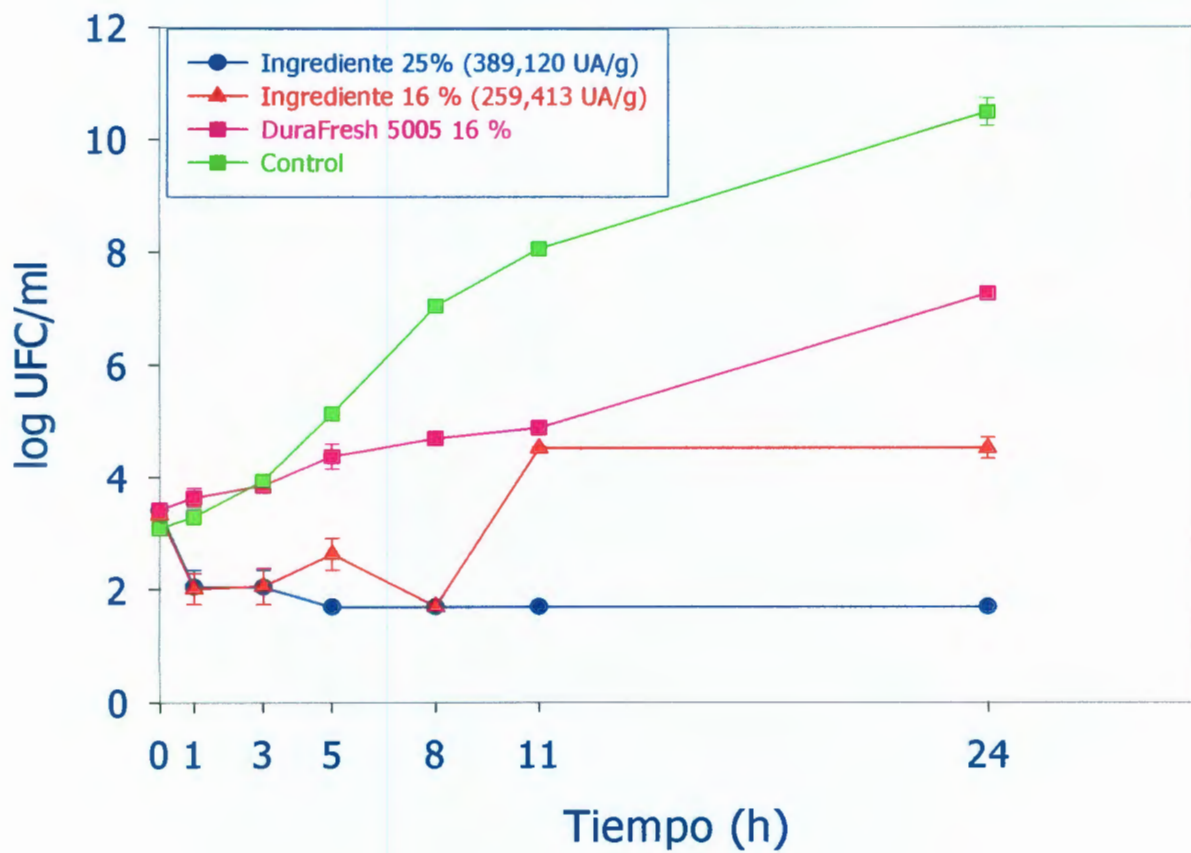
En la figura 12 se observa que el ingrediente antimicrobiano al 16% es más eficiente durante las primeras 8 horas de incubación pero después de este tiempo la bacteria fue capaz de adaptarse a esta concentración. Aun así el ingrediente antimicrobiano mostró ser mas eficaz que Durafresh 5005™ ya que a las 24 de incubación la diferencia fue de 2.75 log. Una parte relevante de esta figura es que se observa el tiempo al cual el efecto pasa de ser bacteriostático a bactericida al utilizar la CMI, es decir el tiempo en el cual se da la ausencia completa de crecimiento. Este tiempo es de 5 h después de iniciada la incubación, tiempo que al ser comparado con lo reportado por Benkerroum y Sandine (1988) es mejor, ya que ellos obtuvieron la ausencia completa de crecimiento de *L. monocytogenes* a un tiempo de 48 h al utilizar nisina (3700 UI/mL) en CST (pH=7), a una temperatura de incubación de 37°C.

En un estudio realizado por Ferreira y Lund (1996), la CMI de la nisina (500 UI/mL) contra *L. monocytogenes* F6861 en TSYGB (pH=5) se alcanzó a las 10 h después de la incubación a 20°C. Es importante señalar que la CMI difiere dependiendo de diversos factores como son la concentración de la bacteriocina, la población inicial del microorganismo indicador, el pH del medio, la temperatura de incubación, entre otros.

Se puede concluir que Durafresh 5005™ fue menos efectivo que el ingrediente antimicrobiano debido a que es destinado a la aplicación de productos lácteos (yogurt, crema y queso cottage) que tienen un pH mas ácido que el utilizado en este

experimento (7.3). Otra de las razones por las que probablemente no haya sido tan efectivo es que su espectro de acción no incluya a *L. monocytogenes*, sin embargo esto nos permitió observar que el ingrediente antimicrobiano presenta especificidad hacia esta bacteria patógena.

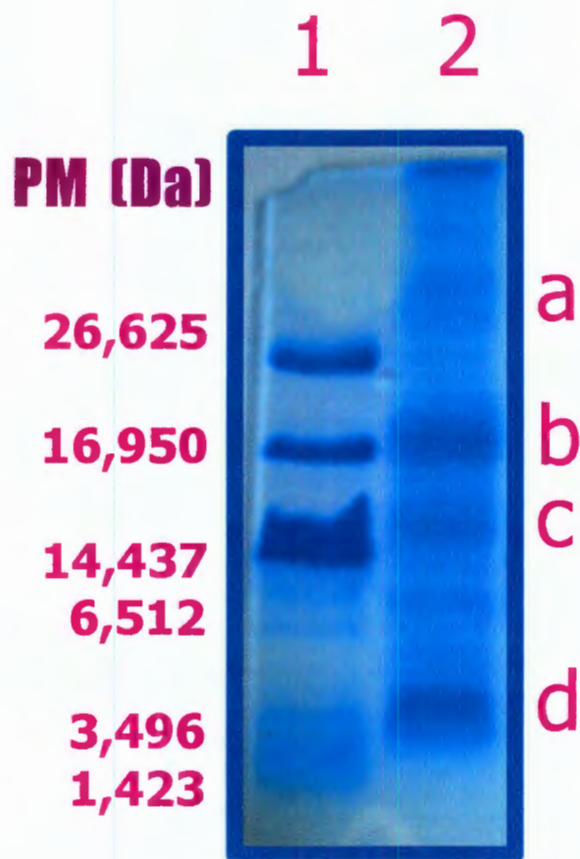




**Fig. 12.** Comparación del efecto antilisterial del ingrediente antimicrobiano contra DuraFresh 5005™ en CST (pH = 7.3).

## 6.8 Análisis del ingrediente mediante electroforesis en el sistema Tris-Tricina.

Para demostrar que la actividad antimicrobiana del ingrediente es de naturaleza proteica, se realizó una purificación parcial de los extractos. Posteriormente se llevó a cabo la electroforesis en el sistema tris-tricina (Ausubel et al., 1995) se obtuvieron las bandas correspondientes a los péptidos o proteínas, las cuales podrían ser bacteriocinas, al identificar la banda que presente actividad antimicrobiana sobre *M. luteus*. En la figura 13 se observa el zimograma de la electroforesis del EC obtenido mediante la fermentación de suero lácteo suplementado. En el carril 1 se muestran los estándares de peso molecular y en el carril 2 la muestra. Como se observa en la fotografía del gel, se obtuvieron 4 bandas las cuales fueron denominadas "a, b, c y d". Estas 4 bandas se cortaron con bisturí estéril tomando como patrón a la parte teñida del gel. Sánchez (2003) reportó que la fracción "d" fue la que mostró la mayor actividad antimicrobiana como puede observarse en la figura 14, cuyo peso molecular estimado es de 3.7 kDa aproximadamente, valor que es similar al peso molecular de la nisina según lo reportado por Yang *et al.*, en 1992.



**Fig. 13.** Gel de electroforesis en sistema Tris-Tricina teñido con azul de Coomasie. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular y 2) EC de *L. lactis* UQ2.



**Fig. 14.** Identificación de la banda con actividad antimicrobiana contra *M. luteus* NCIB8166. Halos de inhibición por las bandas de gel que se observan en la figura 13.

## 6.9 Cinética de inhibición de *Listeria monocytogenes* Scott A en lechuga

Se consideró relevante elegir a la lechuga como hortaliza a evaluar debido a la incidencia de *L. monocytogenes* en dicho producto y el hecho de ser altamente consumida en varios países. Por otra parte, se ha incrementado el interés de la inocuidad de las hortalizas crudas y precortadas ya que el tejido expuesto de dichas hortalizas puede ser colonizado más fácilmente por bacterias patógenas que en el producto intacto. Esto se debe a la alta disponibilidad de nutrientes que se encuentran en las superficies cortadas y al potencial de contaminación debido a la mayor manipulación de los alimentos siendo la refrigeración el único método de conservación. Algunos de estos contaminantes son bacterias psicrótrofas tales como *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas hydrophila*. Estos patógenos son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración. Esto aunado a la alta humedad del producto, a la ausencia de un tratamiento letal y al abuso de temperatura al que son sometidos ocasionalmente, proveen las condiciones y el tiempo necesarios para la sobrevivencia y crecimiento de estos microorganismos (Szabo *et al.*, 2000).

Los distintos tratamientos fueron elegidos por las siguientes razones: (a) grupo de lechugas sin tratamiento (control 1): para observar el comportamiento en el crecimiento de *L. monocytogenes* en la lechuga sometida a temperatura de refrigeración y en ausencia de agentes inhibitorios. (b) grupo de lechugas tratadas con agua destilada estéril (control 2): para observar el efecto ocasionado por la aspersion ejercida sobre la superficie de la hoja de lechuga. (c) grupo de lechugas tratadas con una solución de ácido láctico a una concentración de 2 g/L: para determinar el efecto del ácido láctico por si solo. (d) grupo de lechugas tratadas con una solución combinada de ácido láctico 2 g/L e ingrediente antimicrobiano a una concentración de 64,853 UA/g: para determinar si existía un efecto combinado entre ambos agentes inhibitorios. Y por último el tratamiento (e) grupo de lechugas tratadas con una solución del ingrediente antimicrobiano a una concentración de 64, 853 UA/g: para determinar el efecto del ingrediente antimicrobiano por si solo.

El inóculo inicial fue de  $10^5$  UFC/g de lechuga. Previo a la elección de la población a utilizar, fue necesario estandarizar la técnica, para lo cual algunos parámetros se basaron en la revisión bibliografica, mientras que otros se obtuvieron en base a

experimentación preliminar. Observamos, que se requería un tiempo de 45 min para secar las hojas de lechuga después del lavado, tiempo no especificado en la revisión bibliográfica; después de la inoculación, se requirió de 1.5 h para secar en campana de flujo laminar el inóculo sobre la superficie de la hoja de lechuga. Aunque para este rubro nos basamos en el experimento realizado por Park *et al.* (2001), en el cual se tuvo la necesidad de incrementar 0.5 h más de lo reportado por los autores. Burnett *et al.* en el 2004, se utilizaron dos tratamientos de secado del inóculo, uno de ellos utilizando una temperatura de 25°C durante 30 min y el otro a 37°C durante 45 min, observándose que el segundo tratamiento condujo a un mayor porcentaje de células muertas que el primero (25°C, 30 min).

Para observar el efecto que tenía el tiempo de secado del inóculo antes de la aplicación de los tratamientos, se hicieron pruebas en las cuales se observó que durante el tiempo de 1.5 h, la población disminuía 1 ciclo logarítmico aproximadamente, por lo que se tuvieron que inocular poblaciones de  $10^6$  ufc/g para después del secado tener la población de  $10^5$  ufc/g deseada al aplicar los tratamientos. En el estudio de Burnett *et al.* (2004), se observó una diferencia de 0.3 ufc/ pieza de lechuga al utilizar dos diferentes métodos de secado, siendo el tratamiento de 25°C durante 30 min, aquel donde se recuperaron mayor cantidad de células viables, independientemente del medio utilizado.

El tiempo que tardaron en secar los distintos tratamientos por aspersion fue de 30 min, para posteriormente realizar el análisis microbiológico. De manera similar, Li *et al.* en el 2002, dejaron secar las lechugas tratadas con soluciones de cloro en campana de flujo laminar por un tiempo de 30 min.

Para elegir las dosis de los tratamientos a utilizar nos basamos en los resultados obtenidos del isoblograma donde se obtuvo una ausencia completa de crecimiento al utilizar 2 g/L de ácido láctico y 64, 853 UA/g del ingrediente antimicrobiano en combinación contra *L. monocytogenes* Scott A. Otra razón de utilizar estas dosis fue el hecho de utilizar una cantidad razonable del ingrediente, ya que como se ha mencionado anteriormente, la concentración mínima inhibitoria del ingrediente antimicrobiano resultó elevada, previéndose un efecto conveniente al utilizar la combinación de ambos agentes inhibitorios.

En un estudio realizado por Leverentz *et al.* (2003), se comparó el efecto de aplicar los tratamientos mediante pipeteo o aspersion. Al aplicar los tratamientos de fagos y de

nisina mediante aspersión se obtuvo una mayor reducción en la población de *L. monocytogenes*, lo cual se atribuyó a una mayor cobertura de la superficie de las rebanadas de manzana y melón. Indiscutiblemente, la mayor cobertura y homogeneidad de tratamientos se obtiene por inmersión, pero el alto contenido de humedad remanente en la hoja de lechuga ocasiona que ésta pierda sus características de firmeza, asimismo el tiempo que tarda en secar es mayor al tiempo necesario para secar la hoja de lechuga tratada por aspersión.

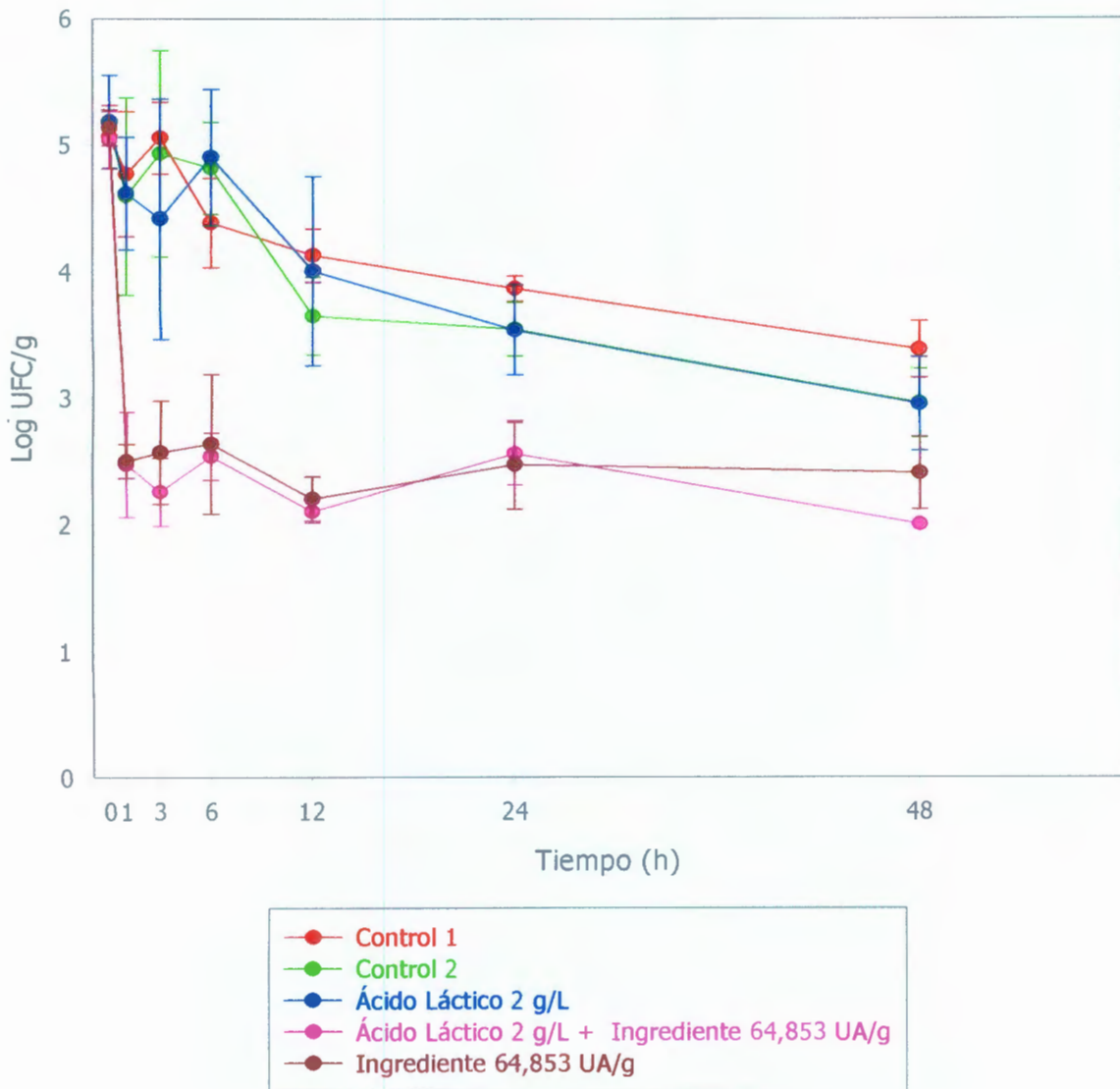
Se observó que en los Controles 1 y 2 (Figura 15) *L. monocytogenes* fue capaz de sobrevivir en la lechuga. Sin embargo, la bacteria no creció durante el almacenamiento, por el contrario, mostró una tendencia a morir y se atribuyó este hecho a la posible deshidratación de la lechuga durante el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, la velocidad de crecimiento se redujo significativamente cuando disminuye la temperatura de almacenamiento. El Control 2 se utilizó para observar el efecto de la aspersión sobre la población, sin embargo puede concluirse que el efecto fue nulo, ya que no existió diferencia significativa (Cuadro 112) respecto al Control 1 durante las primeras 24 h de almacenamiento.

En la lechuga el efecto de ambos agentes inhibitorios no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ), al compararlo con el tratamiento donde se utilizó el ingrediente antimicrobiano de manera independiente (Figura 15). Este resultado contrasta con el comportamiento en medio de cultivo donde ambos antimicrobianos presentaron un efecto combinado aditivo. El efecto inhibitorio es básicamente atribuible al ingrediente antimicrobiano, ya que el efecto del ácido láctico no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha = 0.05$ ) respecto a los Controles 1 y 2, durante las primeras 24 h. Este efecto pudo deberse a que una parte muy pequeña del ácido láctico penetró en el tejido de la lechuga mientras que los iones hidrógeno del ácido láctico remanente fueron neutralizados por las proteínas de la superficie de la lechuga, resultando en un incremento del pH de la superficie durante el almacenamiento. Además, probablemente el ácido láctico se encontraba casi completamente disociado al tener la lechuga un pH= 6, más de dos unidades de pH arriba de su pKa (3.86). Mustapha *et al* (2002), realizaron un estudio utilizando ácido láctico al 2%, 400 UI/mL de nisina y la combinación de ambos agentes en carne cruda sobre *E. coli*. Se obtuvo un mejor efecto inhibitorio por parte del ácido láctico al 2% y de la combinación de ambos agentes que el efecto de la nisina por sí sola. La

diferencia de dicho estudio con nuestros resultados pudo deberse a que existen factores intrínsecos en los alimentos que reducen la actividad de las bacteriocinas. La mayoría de las bacteriocinas son hidrofóbicas, por lo que pueden unirse a grasas y fosfolípidos, los cuales se encuentran en mayor cantidad en la carne evaluada por los autores, viéndose disminuido el efecto de la nisina.

Un resultado muy satisfactorio fue el que se obtuvo al utilizar el ingrediente antimicrobiano por sí solo ya que al compararlo con el Control 1, se redujo la población  $2.26 \log \text{ ufc/g}$  durante la primera hora después de aplicar los tratamientos, pudiendo sugerir así que el ingrediente antimicrobiano tiene un efecto rápido al inhibir la población de *Listeria*. Durante el almacenamiento esta inhibición se mantiene teniendo una reducción en la población a las 3, 6, 12, 24 y 48 h de  $2.48 \log \text{ ufc/g}$ ,  $1.75 \log \text{ ufc/g}$ ,  $2.18 \log \text{ ufc/g}$ ,  $1.39 \log \text{ ufc/g}$  y  $1.46 \log \text{ ufc/g}$  respectivamente, lográndose la mayor inhibición a las 3 h de almacenamiento. Una contribución relevante de este experimento es el hecho de haber probado el ingrediente antimicrobiano en lechuga, ya que los estudios de aplicación de bacteriocinas realizados por diversos autores han sido aplicados básicamente a quesos y carnes, y a partir de nuestros resultados puede ampliarse el estudio y la investigación a otras hortalizas y frutas.





**Fig. 15.** Cinética de inhibición de *L. monocytogenes* en lechuga. Cada punto representa la media de tres réplicas.

Cuadro 12. Población ( $\log_{10}$  UFC/g) de *Listeria monocytogenes* después de aplicar los tratamientos en lechuga romana almacenada a 6 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (h)						
	0	1	3	6	12	24	48
Control 1 <sup>&amp;</sup>	5.05 a	4.76 a	5.05 a	4.38 a	4.38 a	3.86 a	3.86 a
Control 2 <sup>*</sup>	5.17 a	4.59 a	4.92 a	4.81 a	3.65 a	3.54 a	2.95 b
Ácido láctico (2 g/L)	5.18 a	4.61 a	4.41 a	4.90 a	4.00 a	3.53 a	2.95 b
Ácido láctico (2 g/L) + Ingr. (64,853 UA/g)	5.03 a	2.47 b	2.25 b	2.53 b	2.10 b	2.55 b	2.00 c,d
Ingrediente (64,853UA/g)	5.13 a	2.50 b	2.57 b	2.63 b	2.20 b	2.47 b	2.40 b,c

Los datos representan las medias de tres mediciones. Medias con diferente letra son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

<sup>&</sup>Control 1; *Listeria monocytogenes* inoculada con micropipeta.

<sup>\*</sup>Control 2; igual que Control 1 pero asperjada con agua destilada estéril.



**Fig. 16.** Método de secado en campana de flujo laminar de lechuga inoculada con *L. monocytogenes* .

## 7. CONCLUSIONES

1. Se logró la producción de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel de biorreactor usando suero lácteo suplementado. La mayor actividad antimicrobiana se obtuvo a las 11 h de fermentación, siendo de 12, 800 UA/mL.
2. El conjunto de sustancias producidas, una vez retiradas las células, se consideró como un ingrediente antimicrobiano, el cual mantuvo la misma actividad antagónica después del secado por aspersión. Este proceso es un método económico para la producción a gran escala del ingrediente antimicrobiano y de forma conveniente para su aplicación en alimentos.
3. Mediante el isoblograma se pudo determinar que el efecto combinado ingrediente-ácido láctico en CST es aditivo en medio de cultivo, permitiendo el uso de menores concentraciones del ingrediente para obtener el mismo efecto antimicrobiano.
4. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se pudo determinar que uno de los componentes del ingrediente es un antimicrobiano de naturaleza protéica, sugiriendo así la posibilidad de que sea una bacteriocina. El peso molecular estimado fue de alrededor de 3.5 kDa.
5. La aplicación del ingrediente antimicrobiano en lechuga resultó, al compararlo con el Control 1 (*L. monocytogenes* asperjada con agua), en una reducción en la población de 2.26 log ufc/g durante la primera hora, manteniéndose la misma inhibición durante las 48 h de almacenamiento.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. 28: 169-185.
- Alais, C. (1970). *Ciencia de Leche. Principios de Técnica Lechera*. Editorial Continental. México. pp. 137-143.
- Alzamora, S., Tapia, M., López-Malo, A. (2000). Minimally processed fruits and vegetables. En: *Hurdle technology in the design of minimally processed foods, Use of biopreservation in minimal processing of vegetables y Microbial ecology of spoilage and pathogenic flora associated to fruits and vegetables*. Aspen Publications. USA. pp. 13-15, 43-49, 265-276.
- Ariyapitipun, T., Mustapha, A., Clarke, A. (2000). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *Journal of Food Protection*. 63(1): 131-136.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology*. 3a Ed. pp. 10.11-10.12
- Badui, S. (1993). *Química de los alimentos*. Pearson Education. México. pp. 593-611.
- Benkerroum, N., Sandine, W. (1988). Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*. 71:3237-3245.
- Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., Filali-Maltouf, A. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 960-968.
- Bennik, M., van Overbeek, W., Smid, E., Gorris, L. (1999). Biopreservation in modified atmosphere stored mungbean sprouts: the use of vegetable-associated bacteriocinogenic lactic acid bacteria to control the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 28: 226-232.
- Beuchat, I., Nail, B., Adler, B., Clavero, M. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. *Journal of Food Protection*. 61(10): 1305-1311.
- Bhunia A., Johnson M., Ray B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilacti*. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 261-268.

- Branen, J., Davidson, M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Intl. Journal of Food Microbiology*. 90:63-74.
- Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O., Sahl H., de Kruijff B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*. 286: 2361-2364.
- Bruno, M., Montville, T. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. pp. 3003-3010.
- Buchanan, R. y Klawitter, L. (1992). Effectiveness of *Carnobacterium piscicola* LK5 for controlling the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A in refrigerated foods. *Journal of Food Safety*. 12: 219-236.
- Burnett, A., Iturriaga, M., Escartin, E.F., Pettigrew, C., Beuchat, L. (2004). Influence of variations in methodology on populations of *Listeria monocytogenes* recovered from lettuce treated with sanitizers. *Journal of Food Protection*. Vol. 67 (4) : 742-750.
- Cai Y., Ng L., Farber J. (1997). Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. *Journal of Applied Microbiology*. 83: 499-507.
- Calderón-Miranda M., San Martín-González M., Barbosa-Cánovas G., Swanson B. (1998). Métodos no térmicos para el procesamiento de alimentos. *Cuadernos de Nutrición*. 21 (4): 30-35.
- CDC. (2001). Centers for disease control and prevention. Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo>. p.p. 1-25.
- Choi, S. y Beuchat, L. (1994). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* M during fermentation of kimchi. *Food Microbiology*. 11: 301-307.
- Cintas L., Casaus M., Herrenz C., Nes I., Hernández P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4): 281-305.
- Cleveland McEntire, J., Montville, T., Chikindas, M. (2003). Synergy between nisin and select lactates against *Listeria monocytogenes* is due to the metal cations. *Journal of Food Protection*. 66 (9): 1631-1636.
- Daeschel, M. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. pp. 164-167.
- Davidson M., Branen A. (1993). *Antimicrobials in Foods*. 2ª Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 95-136.

- Davidson P.M., Parish M.E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*. pp. 148-155.
- Davies, E., Bevis, H., Delves-Broughton, J. (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 24: 343-346.
- Delaquis, P., Stewart, S., Cazaux, S., Toivonen, P. (2002). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. *Journal of Food Protection*. 65(3): 459-464.
- Ennahar, S., Deschamps, N. (2000). Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 449-457.
- FAO. (2002). <http://www.fao.org>. Food and Agriculture Organization.
- Fernández Escartín E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp. 43-48.
- Ferreria M. y Lund B. (1996). The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 433-438.
- Francis, G., O'Beirne, D. (2001). Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 27:111-116.
- Gómez, M. (2003). Reporte de Investigación. Laboratorio de Biotecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Guerra, N., Rua, M., Pastrana, L. (2001). Nutricional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*. 70: 267-281.
- Harp, E., Gilliland, S. (2003). Evaluation of a select strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as a biological control agent for pathogens on fresh-cut vegetables stored at 7°C. *Journal of Food Protection*. 66(6): 1013-1018.
- Harper J.W. (2000). Biological properties of whey components. A Review. The American Dairy Products Institute.
- Hasper, H., de Kruijff, B., Breukink, E. (2004). Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*. 43(36): 11567-75.

- Hoover, D. y Steenson, L. (1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: The molecular biology of nisin and its structural analogues y Nonnisin bacteriocins in Lactococci: Biochemistry, genetics and mode of action. pp. 93-119 , 121-146.
- Ibarra J. (1999). Influencia de las condiciones de crecimiento en la producción de la bacteriocina generada por *Lactobacillus plantarum* BAL-1 aislada de kefir. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 42-47.
- IFT. Institute of Food Technologists. (2002). IFT Expert report on emerging microbiological food safety issues. Implications for control in the 21<sup>st</sup> Century. pp. 4-12.
- Jay, J. (2000). Modern Food Microbiology. Aspen Publication. Maryland. pp.
- JMP4. (2001). SAS Institute, Inc. Versión 4.0.4.
- Leistner, L. y Gorris, G. (1995). Food preservation by hurdle Technology. Trends Food Science and Technology. 6: 41-46.
- Leverentz, B., Conway, W., Camp, M., Janisiewicz, W., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology. pp. 4519-4526.
- Lewus, C., Montville, T. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Journal of Microbiological Methods. pp. 145-150.
- Li, Y., Brackett, R., Chen, J., Beuchat, L. (2002). Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5°C or 15°C. Journal of Applied Microbiology. 92: 269-275.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2000). Biología de los Microorganismos. Capítulo 16. Diversidad procariótica: dominio bacteria. Prentice Hall. España. pp. 718-721.
- Mayr-Harting A., Hedges A., Berkeley, R. (1972). Methods for studying bacteriocins. En: Methods in Microbiology. Norris, J., Ribbons D. Academic Press. New York. pp. 315-422.
- Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., Griffin, P., Tauxe, R. (1999). Food related illness and death in the United States. Emerging Infection Diseases. 5:607-625.
- Medina L. (2001). Caracterización de los determinantes genéticos de dos bacteriocinas de bacterias lácticas y purificación de una de ellas. Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 39
- Montgomery D. (2002). Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley. New York. pp. 383- 387



- Morgan, S., Hickey, R., Ross, R., Hill, C. (2000). Efficient method for the detection of microbially-produced antibacterial substances from food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 56-62.
- Muriana, P. (1996). Bacteriocins for control *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*. pp. 54-63.
- Mustapha, A., Ariyapitipun, T., Clarke, A. (2002). Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *Journal of Food Science*. Vol 67 (1): 262-267.
- Norma Oficial Mexicana. (1995). NOM-143-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Método de Prueba Microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria Monocytogenes*.
- Nguyen-the C. y Carlin F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34 (4): 371-401.
- Nguyen-the C., Halna-du-Frétay B., da Silva A. (1996). The microbiology of mixed salad containing raw and cooked ingredients without dressing. *International Journal of Food Science and Technology*. 31: 481-487.
- Park, C., Hung, Y., Doyle, M., ezeike, G., Kim, C. (2001). Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Science*. 66 (9): 1368-1372.
- Ray B., Daeschel, M. (1992). Food biopreservatives of microbial origin. CRC Press. Florida. pp. 1-55, 103-264.
- Salminen S. y von Wright A. (1993). Lactic acid bacteria. Maecel Dekker. New York. pp. 1-64, 127-159.
- Sánchez Ortega, I. (2003). Uso del permeado de suero suplementado en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Schägger H., von Jagow, G. (1987). Tricine-solution dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*. 166. 368-379.
- Schillinger U., Geisen R., Holzappel W. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science and Technology*. 7: 158-164.
- Silva, J., Carvalho, A., Teixeira, P., Gibbs, P. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 77-81.

- Sorrells, K., Engil, D., Hatfield, J., (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52(8): 571-573.
- SSA. (2002). Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. 2002.
- Stiles M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Stiles M. y Holzapfel W. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.
- Swanson, K., Busta, F., Peterson, E., Johnson, M. (1992). Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. En: Colony count methods. APHA. Washington, D.C.
- Szabo, E., Scurrah, K., Burrows, J. (2000). Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 456-460.
- Tramer, J. Fowler, G. (1964) Estimation of nisin in foods. *Journal of Food Science Agric*. 15: 522-528,
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J.(1996). Polyphasic taxonomy, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 60: 407-438.
- Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarolo, Scolari, G. (1996). Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetable. *Journal of Applied Bacteriology*. 81: 113-119.
- Wood B. y Holzapfel W. (1995). The genera of lactic acid bacteria. 1ª Ed. Blackie Academic & Professional. Glasgow. pp. 173-234.
- Yang, R., Johnson, M., Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. pp. 3355-3359.
- Yang, R., Ray, B. (1994) Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 11: 281-291.

## 9. ANEXOS

Cuadro 13. ANOVA a las 0 h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=0	4	0.0554	0.0138	0.1686	0.9495
Error	10	0.8221	0.0822		
C. Total	14	0.8775			

Cuadro 14. ANOVA a la 1ra. h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=1	1	16.9992	4.2498	17.2321	0.0002
Error	10	2.4662	0.2466		
C. Total	1	19.4654			

Cuadro 15. ANOVA a la 3ra. h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=3	4	21.3040	5.3260	14.1732	0.0004
Error	10	3.7578	0.3757		
C. Total	4	25.0618			

Cuadro 16. ANOVA a la 6ta. h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=6	4	16.5083	4.1271	23.2799	<.0001
Error	10	1.7728	0.1772		
C. Total	4	18.2812			

Cuadro 17. ANOVA a la 12va. h de almacenamiento de lechuga.

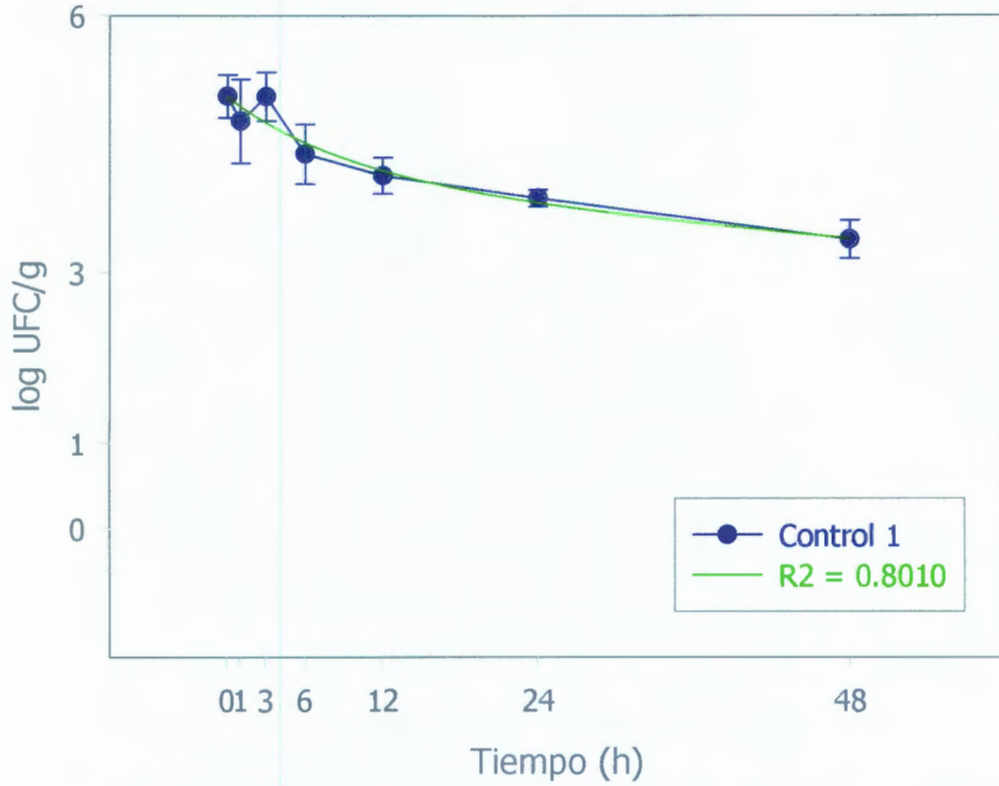
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=12	4	13.2979	3.3245	20.6169	<.0001
Error	10	1.6125	0.1612		
C. Total	4	14.9105			

Cuadro 18. ANOVA a las 24 h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=24	4	4.8636	1.2159	16.6180	0.0002
Error	10	0.7316	0.0731		
C. Total	4	5.5952			

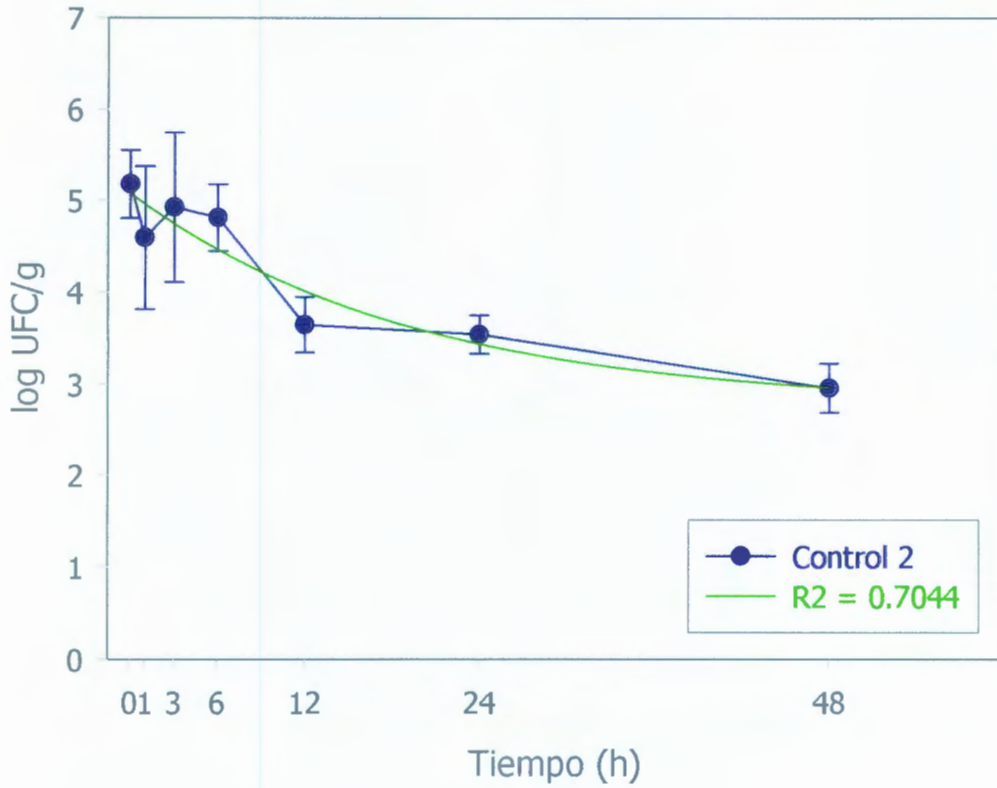
Cuadro 18. ANOVA a las 48 h de almacenamiento de lechuga.

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Prob&gt;F</b>
T=48	4	5.9245	1.4811	24.4380	<.0001
Error	10	0.6060	0.0606		
C. Total	4	6.5306			



**Figura 17. Ajuste de Modelo para el Control 1: Disminución Exponencial (Doble, 4 Parámetros)**

$$y = ( 0.9156 ) e^{-( 0.1068 )x} + ( 4.1316 ) e^{- ( 0.0041 )x}$$



**Figura 18. Ajuste de Modelo para el Control 2: Disminución Exponencial (Doble, 5 Parámetros)**

$$y = 2.7699 + (0.9852) e^{- (0.0516) x} + (1.3215) e^{- (0.0513) x}$$

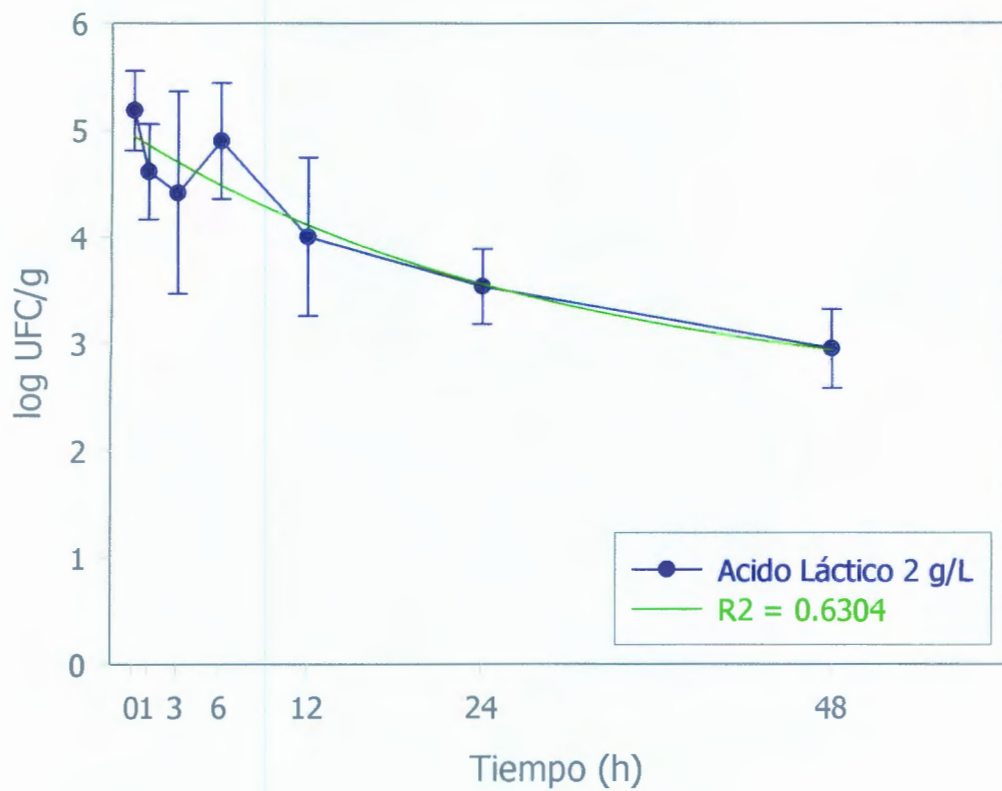


Figura 19. Ajuste de Modelo para el Ác. Láctico: Disminución Exponencial (Doble, 4 Parámetros)

$$y = ( 2.5040 ) e - ( 0.0334 )x + ( 2.4376 ) e - ( 0.00 )x$$



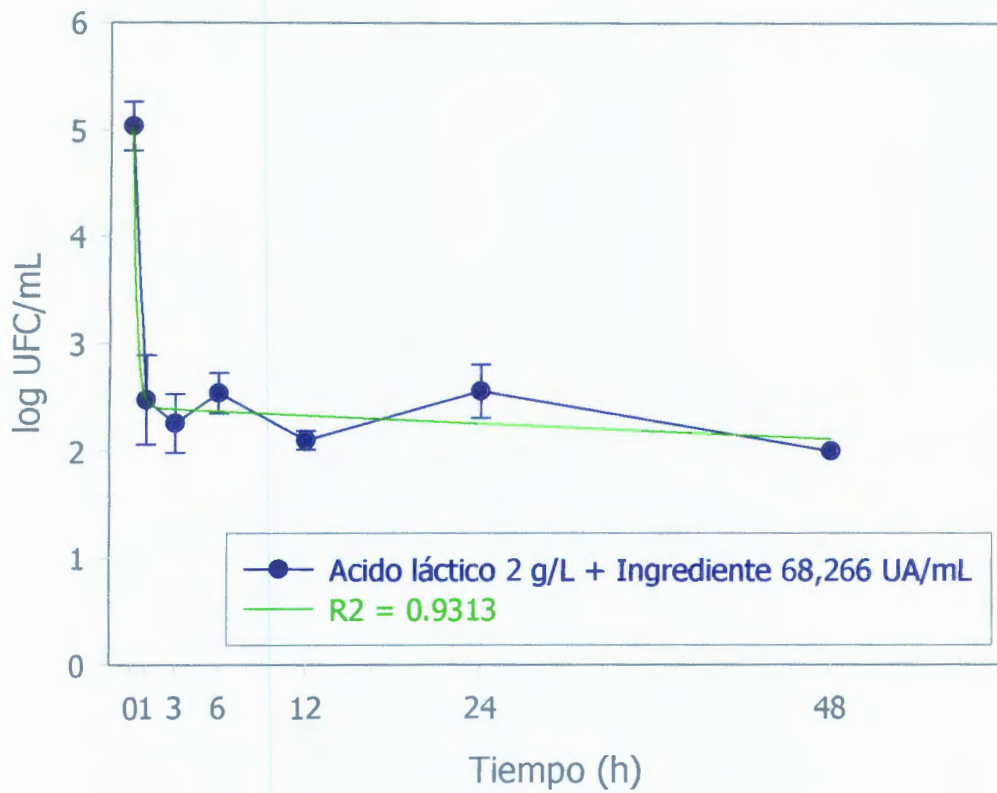


Figura 20. Ajuste de Modelo para la solución combinada: Disminución exponencial (Doble, 4 parámetros)

$$y = ( 2.6272 ) e - ( 3.5752 )x + ( 2.4080 ) e - ( 0.0027 )x$$

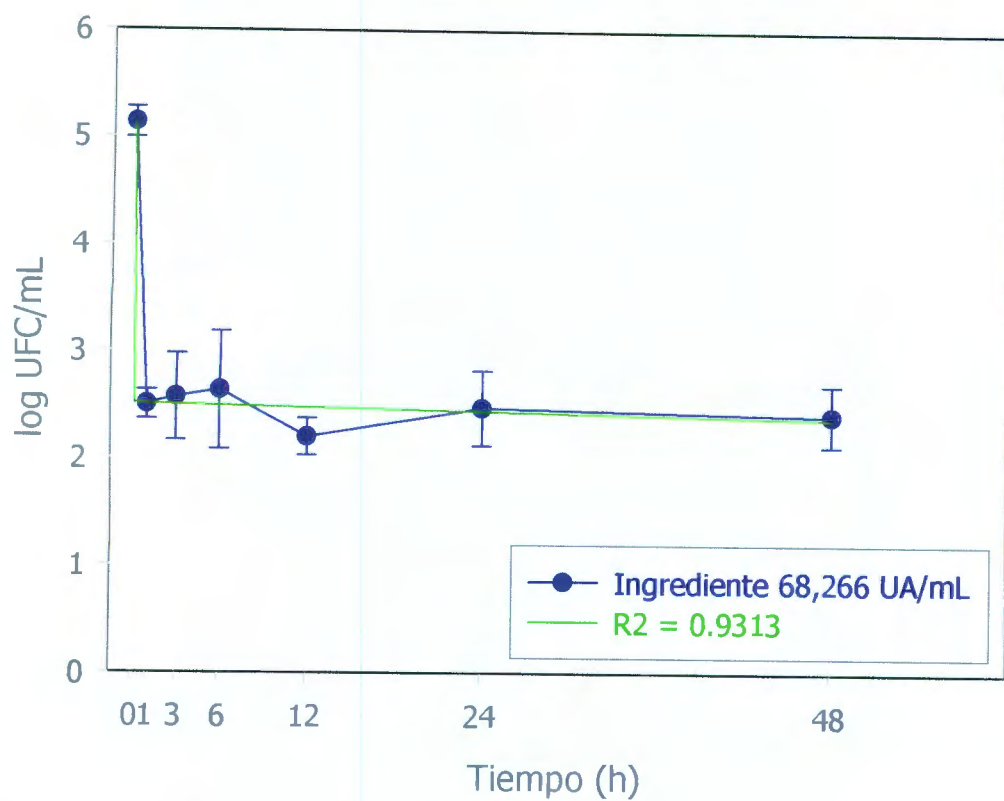


Figura 21. Ajuste de Modelo para el ingrediente antimicrobiano: Disminución Exponencial (Doble, 4 Parámetros)

$$y = ( 2.6247 ) e - ( 50.8590 )x + ( 2.5092 ) e - ( 0.0012 )x$$